ß-Endorphin im Plasma des Menschen während der Perinatal-Periode

Ein Beitrag zur Frage der Bedeutung von Endorphinen beim Stressgeschehen

Katharina Csontos

1981

ß-Endorphin im Plasma des Menschen während der Perinatal-Periode

Ein Beitrag zur Frage der Bedeutung von Endorphinen beim Stressgeschehen

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt von
Katharina Csontos
aus Budapest
Januar 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Dr. Achim Raab
2. Berichterstatter: Dr Lutz Gürtler
Tag der Prüfung: 30.März 1981

Herrn Professor Dr. Albert Herz, Direktor der Abteilung für Neuropharmakologie im Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für sein förderndes Interesse.

Herrn Dr. Meinhard Rust, Oberarzt im Institut für Anaesthesiologie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München gilt mein ganz besonderer Dank für seine Anregung bei der Arbeit, die Beschaffung des biologischen Materials für die Peptidbestimmungen und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Volker Höllt danke ich für die Einführung in die radioimmunologischen Bestimmungsmethoden, für die geduldige Mithilfe bei den chromatographischen Trennmethoden und für die wertvollen Diskussionen bei der Korrektur der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0058

Liste der Abkürzungen

RIA	=	Radioimmunassay
RRA	=	Radiorezeptorassay
ir-ß-END	=	immunreaktives ß-Endorphin
HVL	=	Hypophysenvorderlappen
KRB	=	Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung
ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon
GH	=	Wachstumshormon
LH	=	Luteinisierendes Hormon
MSH	=	Melanozyten stimulierendes Hormon
LPH	=	Lipotropin

Liste der Abbildungen

1.) Kreuzreaktivität des ß-Endorphin-Antiserums
2.) Konzentrationen von immunoreaktivem ß-Endorphin im Plasma von schwangeren Frauen unter Oxytocin-Infusion
3.) Plasmakonzentrationen von immunoreaktivem ß-Endorphin und ACTH während der Normalgeburt
4.) Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma der Mütter im Vergleich zum Nabelschnurvenen- und Arterien-Plasma der Neugeborenen
5.) Trennung der ß-Endorphin-immunoreaktiven Komponenten in Plasma- und Hypophysenextrakte mittels Gelfiltration (Sephadex G50 SF)
6.) Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma während schmerzfreier Geburt (unter Epiduralanästhesie = EDA)
7.) Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma während operativer Schnittentbindungen
8.) Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma während diagnostischer Curettage-Operationen
9.) Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma von Wöchnerinnen während des Stillens 4 Tage nach der Entbindung
10.) Freisetzung von opiat-aktivem Material aus Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen in vitro

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	ZIEL DER ARBEIT	4
3.	MATERIAL UND METHODE	5
3.1.	Einteilung der Untersuchungsgruppen	5
3.1.1.	Schwangere Frauen am Geburtstermin	5
3.1.2.	Normalgeburten	5
3.1.3.	ß-Endorphin-Spiegel im Plasma der Mütter im Vergleich zu den Neugeborenen	6
3.1.4.	Schmerzfreie Geburten (unter Epiduralanästhesie)	6
3.1.5.	Schnittgeburten	7
3.1.6.	Curettagen	7
3.1.7.	Wöchnerinnen während des Stillens	8
3.2.	Präparation von biologischem Material	8
3.2.1.	Präparation von Vorderlappengewebe aus Schweinehypophysen	8
3.2.2.	Superfusion des Hypophysengewebes	8
3.3.	Bestimmung der Gesamt-Opiat-Aktivität im Bindungstest (Radiorezeptorassay)	9
3.4.	Extraktionsmethoden	10
3.4.1.	Extraktion von ß-Endorphin aus Humanplasma	10
3.4.2.	Extraktion von ß-Endorphin aus fötalen Hypophysen	12
3.5.	Trennung der ß-Endorphin-immunoreaktiven Komponenten in Humanplasma und Hypophysenextrakten durch Gelfiltration	12
3.6.	Radioimmunologische Bestimmungsmethoden	13
3.6.1.	Radioimmunassay für ß-Endorphin	13
3.6.2.	Radioimmunassay für ACTH	18

Seite

4. ERGEBNISSE 19

4.1. Nachweis von ß-Endorphin im Plasma von nichtschwangeren weiblichen Kontrollpersonen 19

4.2. Konzentrationen von ß-Endorphin im Plasma von schwangeren Frauen unter Oxytocin-Infusion 19

4.3. Plasmakonzentrationen von ACTH und ß-Endorphin während der Normalgeburt 21

4.3.1. ß-Endorphin im mütterlichen Plasma und im Plasma des Neugeborenen 21

4.3.2. ACTH im mütterlichen Plasma und im Plasma des Neugeborenen 23

4.3.3. ß-Endorphin in Nabelarterien- und Venenplasma der Neugeborenen 23

4.3.4. Bestimmung der ß-Endorphin immunoreaktiven Komponenten im Plasma 25

4.4. Nachweis von ß-Endorphin und ß-LPH in Vorder- und Mittellappen fötaler Hypophysen 25

4.5. ß-Endorphin-Spiegel im mütterlichen Plasma und im Plasma von Neugeborenen unter besonderen Geburtsbedingungen 27

4.5.1. Bei schmerzfreier Geburt (unter Epiduralanästhesie) 27

4.5.2. Operative Schnittentbindung 27

4.6. Plasma ß-Endorphin-Spiegel bei Curettage-Operationen 30

4.7. Plasma ß-Endorphin-Spiegel während des Stillens 30

Seite

4.8. In vitro-Freisetzung von Opioid-aktiven Substanzen aus Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen 33

5. DISKUSSION 35

6. ZUSAMMENFASSUNG 49

7. LITERATUR 50

1. EINLEITUNG

Die Opiatforschung hat in den letzten 7 Jahren eine lebhafte Entwicklung durchgemacht. Die wesentlichen Impulse kamen 1973 durch den Nachweis der Opiatrezeptoren durch die Arbeitsgruppen von Snyder, Simon und Terenius (66, 77, 79).

1975 folgte dann die Isolierung endogener Liganden für diese Rezeptoren. Die ersten in ihrer Struktur aufgeklärten opiatartig wirkenden endogenen Substanzen waren die Pentapeptide Methionin- und Leucin-Enkephalin (Hughes et al.,1975) (38). Es fiel auf, daß die Aminosäuresequenz des Methionin--Enkephalins in der Sequenz des Hypophysenhormons ß-Lipotropin enthalten war, eines aus 91 Aminosäuren bestehenden Peptids, dessen Struktur bereits 10 Jahre zuvor von Li aufgeklärt worden war (48). Methionin-Enkephalin umfaßte dabei die Aminosäurepositionen 61 - 65 des ß-Lipotropins. Später konnte dann gezeigt werden, daß eine ganze Reihe C-terminaler Fragmente des ß-Lipotropins opiatartige Aktivität aufweisen (Goldstein) (24). Man nannte diese Peptide entsprechend der Reihenfolge ihrer Identifizierung α-Endorphin, (ß-LPH61-76); ß-Endorphin, (ß-LPH61-91); und γ-Endorphin, (ß-LPH61-77). Von diesen Endorphinen scheint nur das ß-Endorphin unter physiologischen Bedingungen vorzukommen, bei α- und γ-Endorphin handelt es sich offenbar um Bruchstücke des ß-Endorphins, die bei der Extraktion artifiziell gebildet werden (Rossier et al., 1977) (71).

1977 wurde dann gefunden, daß ß-Endorphin, ß-Lipotropin und ACTH von einem gemeinsamen Vorläufermolekül mit einem Molekulargewicht von etwa 30 000 abstammen (Mains et al.) (53), für das der Name "Pro-Opiocortin" vorgeschlagen wurde (Rubinstein et al.) (72).

Die Nukleotidsequenz der m-RNA, die für das Rinder-Corticotropin-ß-Endorphin Vorläufermolekül codiert wurde, wurde 1978 im Laboratorium von Numa kloniert und die Nukleotidsequenz der m-RNA dieses Proteins aufgeklärt (Nakanishi et al., 1978) (59).

Mittels immunohistochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß ß-Endorphin, ß-Lipotropin und ACTH in denselben Vesikeln der corticotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens nachweisbar sind (Weber et al.) (83). Die höchsten Konzentrationen dieser Peptide findet man in der Hypophyse. Über die immunohistochemische Lokalisation von ß-Endorphin im Hypophysenvorderlappen und im Hypophysenmittellappen berichtete Bloom et al. (7) über die Lokalisation von ß-LPH Pelletier (65). Weber führte den Nachweis der gemeinsamen Lokalisation von ACTH/ß-LPH/ß-Endorphin in den corticotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens (83); der Nachweis der hypophysären ACTH/MSH-Zellen gelang Phifer et al. (67).In der menschlichen fötalen Hypophyse wurde die immunohistochemische Lokalisation von ACTH und MSH-Aktivität von Dubois et al. (18), die von - und ß-Endorphin von Li et al. (49) untersucht. Daneben fand man auch im Nucleus arcuatus des Hypothalamus Zellen, die ß-Endorphin/ß-Lipotropin enthalten (Bloom et al., Bloch et al., Zimmermann et al. und Krieger et al) (8, 6, 87, 44). Die Fasern dieser Zellen projizieren in Abschnitte des limbischen Systems und des zentralen Höhlengraus des Mittelhirns. Insbesondere die Ausbreitung von ß-Endorphin-haltigen Fasern in das zentrale Höhlengrau war interessant, da man von dort aus durch Mikroinjektion von Opiaten (Bloom et al.) (8) bzw. von ß-Endorphin (Loh et al.) (52) oder durch elektrische Stimulierung (Hosobuchi et al.) (36) Analgesie auslösen kann.

Da die Aminosäuresequenz des Methionin-Enkephalins mit den ersten 5 Aminosäuren des ß-Endorphins identisch ist, lag es nahe zu vermuten, daß das Methionin-Enkephalin aus dem ß-Endorphin gebildet wird. Jedoch wurde diese Hypothese wieder fallen gelassen, nachdem man herausfand, daß Methionin-Enkephalin und ß-Endorphin eine ganz unterschiedliche Verteilung im Gehirn und in der Hypophyse besitzen. So fand man Methionin-Enkephalin-haltige Zellen in weiten Bereichen des Gehirns, vor allem aber im Bereich der Stammganglien,

in denen kein ß-Endorphin zu finden war (Bloom et al.) (8). Methionin-Enkephalin-haltige Fasern wurden auch im Neurallappen der Hypophyse gefunden, im Gegensatz von ß-Endorphin, das nur im Vorder- und Mittellappen der Hypophyse vorkommt (Rossier et al.) (71). Dies führte zu der Annahme, daß Methionin-Enkephalin ein von ß-Endorphin verschiedenes Vorläufermolekül besitzen muß. Obwohl man dieses Vorläufermolekül noch nicht genau kennt, gibt es bereits starke experimentelle Hinweise für dessen Existenz. Dasselbe gilt für Leucin--Enkephalin, dessen Verteilung sehr ähnlich oder identisch mit dem des Methionin-Enkephalins zu sein scheint. Inwieweit zwei kürzlich isolierte endogene Peptide, das α-Neo-Endorphin (Kanagawa et al, 1978) (42) und das Dynorphin (Goldstein et al., 1979) (25), die beide die Aminosäuresequenz des Leucin-Enkephalins enthalten, als tatsächliche Vorläufermoleküle des Pentapeptids in Frage kommen, bleibt noch zu klären.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß wir es hierbei mit mehreren endorphinergen Systemen der Hypophyse und des Gehirns zu tun haben (Zimmermann et al., 1978) (86), die auch je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen haben dürften (Meites et al.) (55).

Über die physiologische Bedeutung der Endorphine ist bisher nur sehr wenig bekannt. Eine mögliche Rolle bei der Adaption des Organismus auf Stress scheint im Falle des ß-Endorphins gegeben zu sein.

2. ZIEL DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war es, Informationen über die Freisetzungsbedingungen und die mögliche physiologische Funktion hypophysärer Endorphine zu gewinnen.

Schwangerschaft und Geburt schienen ein geeignetes Modell für diese Untersuchungen darzustellen. Einerseits kommt es hierbei zu einer Aktivierung und Umstellung im endokrinen System. Erhöhte Spiegel für ACTH (Kauppila et al.; Arai et al.) (43, 3) und des ACTH-Metaboliten α-MSH (Clarck et al.) (11) wurden bereits nachgewiesen. Andererseits schien die Geburt als schmerzhaftes Ereignis geeignet, Aufschlüsse über eine etwaige Rolle des ß-Endorphins im Sinne einer antinociceptiven Wirkung zu geben.

Der Nachweis von ß-Endorphin unter verschiedenen geburtshilflichen Aspekten (normale Geburt, operative Schnittentbindung, schmerzfreie Geburt) sollte klären, inwieweit der ß-Endorphinspiegel im Plasma von Müttern und von Neugeborenen durch bestimmte Stressfaktoren (Operation, Narkose, Schmerz) beeinflußt wird. Auch war zu prüfen, inwieweit erhöhte ß-Endorphinspiegel Ausdruck vermehrter biologischer Bereitstellung des Peptidhormons in der perinatalen Periode sein würden, wobei deren eigentliche Bedeutung noch zu klären wäre.

Ferner stellte sich die Frage nach dem Ursprung des im Plasma des Neugeborenen nachgewiesenen Endorphins, wobei speziell der Nachweis einer Eigenproduktion von ß-Endorphin in der fötalen Hypophyse wichtig erschien. Eine mögliche physiologische Funktion des in der fötalen Hypophyse und im Plasma der Neugeborenen nachgewiesenen ß-Endorphins war in die Überlegungen einzubeziehen.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Einteilung der Untersuchungsgruppen

3.1.1. Schwangere Frauen am Geburtstermin

Da die sogenannten "Normalgeburten" grundsätzlich unter Oxytocingabe erfolgen, mußte die Möglichkeit einer eventuellen Freisetzungsaktivität von Oxytocin auf ß-Endorphin erwogen werden.

Die Freisetzung von anderen Hormonen durch Oxytocin ist bereits bekannt (Doepfner et al.) (17).

Um den Einfluß von Oxytocin auf die Freisetzung von ir-ß-END zu untersuchen, wurde bei Patientinnen in der 42. Woche der Schwangerschaft durch eine Oxytocin-Infusion (6 I.E. Orasthin^{R}) die Wehenbereitschaft der Uteri getestet; hierzu wurde vor, während sowie nach der Oxytocin-Infusion 10 ml Venenblut entnommen. Die induzierten Wehen wurden mittels eines Kardiotokogramms registriert. Der Plasma ir-ß-END-Gehalt wurde bei 7 Frauen gemessen und die Differenz des Mittelwertes gegenüber Kontrollwerten mit dem gepaarten Student's t-test geprüft.

3.1.2. Normalgeburten

Die Untersuchungsgruppe umfaßte 18 gesunde Gebärende mit unkompliziertem Schwangerschaftsablauf, wobei unter der Geburt sowohl der Gehalt an ir-ß-END, als auch ACTH im Plasma von Mutter und Neugeborenem bestimmt wurde. Alle Frauen bekamen zur Aufrechterhaltung der Wehentätigkeit eine Dauertropfinfusion von 5,7 %iger Glukose mit 6 I.E. Oxytocin (Orasthin^{R}). Alle Blutproben wurden zwischen 8 und 14 Uhr abgenommen. Die Blutentnahmen wurden während der Eröffnungsphase (Muttermundweite 4-6 cm) und der Austreibungsphase während der Wehe und der Wehenpause vorgenommen. Zwischen den jeweiligen Abnahmen bestand ein nur kurzer zeitlicher

Abstand (1-3 Minuten). Das Nabelvenenblut wurde unmittelbar nach der Geburt gewonnen. Am Tage nach der Geburt wurde den Müttern eine weitere Blutprobe entnommen zur Bestimmung der postpartalen Konzentrationen von ir-ß-END. Die einminütigen Apgarwerte der Neugeborenen betrugen jeweils 9 bzw. 10 Punkte.

3.1.3. ß-Endorphin-Spiegel im Plasma der Mütter im Vergleich zu den Neugeborenen

Bei weiteren 12 Frauen wurden unmittelbar nach der Geburt 10 ml venöse Plasmaproben von der Mutter und gleichzeitig Blutproben aus der Nabelarterie und Nabelvene des Kindes entnommen. 100 ml Plasma wurden direkt in die RIA-Ansätze gegeben um die Konzentrationen an ir-ß-END zu ermitteln.

3.1.4. Schmerzfreie Geburten (unter Epiduralanästhesie)

Nach unkompliziert verlaufenden Schwangerschaften wurden 12 Frauen venöse Blutproben während Normalgeburt unter segmentaler Epiduralanästhesie entnommen. Bei allen Geburten wurde zur Aufrechterhaltung der Wehentätigkeit eine kontinuierliche Oxytocininfusion gegeben.

In der Eröffnungsphase bei ca. 5 cm Muttermundöffnung wurde durch die Injektion von 10 ml einer 0,5%igen Carbostesinlösung in den Epiduralraum L_3-L_4 ein guter analgetischer Effekt für die Dauer der Geburt erzielt. Bei diesen Geburten wurden während einer Eröffnungswehe 30 Minuten nach angelegter und wirkender EDA zusätzlich eine Blutprobe abgenommen; ansonsten lief die Abnahme der Blutprobenserie genauso ab wie bei Normalgeburten ohne Epiduralanästhesie. Außer Oxytocin wurde keine Medikation verabreicht.

3.1.5. Schnittgeburten

Bei den Kaiserschnittoperationen (n = 11) wurden zur Anästhesie folgende Medikamente verabreicht:

Premedikation: 0,5 mg Atropin i.v.
Thiopental 3-4 mg/kg Körpergewicht i.v.
Succinylcholin 1 mg/kg Körpergewicht i.v.

Anästhesie mit kontrollierter Beatmung:
Inhalationsmischung:
Lachgas-Sauerstoff 2:1 mit 0,5 Vol.% Halothan bis zur Entwicklung des Kindes, danach Zusatz von 0,8 Vol.% Halothan. Durchschnittliche Einleitungs-/Entwicklungszeit betrug 10 Minuten.

Venöse Blutaliquots wurden vor Narkose, 5 Minuten nach Beginn der Narkose, vor Entbindung (im Moment des operativen Eingriffs), 10 Minuten nach Entbindung, 1 Stunde postoperativ, 1 Tag postoperativ von der Mutter und aus der Nabelvene des Kindes unmittelbar nach der Entbindung abgenommen.

3.1.6. Curettagen

Bei 13 Curettagen, die zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken durchgeführt wurden, wurden in verschiedenen Stadien der Narkose und des operativen Eingriffs Blutproben entnommen.

Folgende Pharmaka wurden bei der Narkose verabreicht:

Premedikation: 0,5 mg/kg Atropin i.v.
Thiopental 4 mg/kg i.v.

Anästhesie unter Spontanatmung:
Inhalationsmischung:
Lachgas-Sauerstoff 2:1 (in einer Mischung von 66% Lachgas und 33% Sauerstoff mit einem Zusatz von 1,5 % Halothan).

Venöse Blutproben wurden vor Narkose, 5 Minuten nach Beginn der Narkose, während der operativen Dilatation des

Cervix, 1 Stunde postoperativ und 1 Tag postoperativ entnommen.

3.1.7. Wöchnerinnen während des Stillens

Im Wochenbett 4 Tage nach Entbindung wurde den Müttern während des Stillens und 1 Stunde nach dem Stillen 10 ml venöse Blutproben entnommen, um den ß-Endorphin-Spiegel während des Stillens mit der Stillpause vergleichen zu können.

5 ml Plasmaproben wurden mit SiO_2 extrahiert, wie unter 3.2. beschrieben. Die ir-ß-END Konzentrationen wurden anschließend im Extrakt bestimmt.

3.2. Präparation von biologischem Material

3.2.1. Präparation von Vorderlappengewebe aus Schweinehypophysen

Zur Untersuchung der Freisetzung von Endorphinen aus der Hypophyse in vitro wurde zerkleinertes Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen präpariert. Die Hypophysen wurden im Schlachthof ca. 20 Minuten nach dem Töten der Tiere entnommen und zum Labor transportiert (Dauer ca. 60-90 Minuten). Die Vorderlappen (durchschnittliches Gewicht 200 mg) wurden vom Hypophysenstiel und Hypophysenhinterlappen mit einer Pinzette abgetrennt. Das Material wurde dann mittels Pinzette bei Zimmertemperatur zerkleinert. Die Durchschnittsgröße der so hergestellten Gewebsstücke betrug etwa 1 mm^3.

3.2.2. Superfusion des Hypophysengewebes

Zerkleinertes Hypophysenvorderlappengewebe aus Schweinehypophysen wurde in einer Superfusionseinheit mit Krebs-

Ringer Bikarbonatlösung (37°C) durchströmt. Nach einer einstündigen Vor-Perfusion wurde die Superfusionslösung mit 10^{-6} bzw. 10^{-9} M Konzentrationen des Peptidhormons Oxytocin versetzt. Das Superfusat wurde in 5-Minuten-Intervallen gesammelt, Aliquots dieser Lösungen wurden im Radiorezeptorassay auf freigesetzte Opiataktivität getestet. Am Ende der Testperiode wurde das Vorderlappengewebe 10 Minuten lang bei 0°C weiter inkubiert, um die Gesamtmenge der aus dem Gewebe freisetzbaren opiataktiven Komponenten bestimmen zu können bzw. nachzuprüfen, ob die Speicher (Sekretgranula) während der Testperiode intakt geblieben sind. Bei niedrigen Temperaturen wird die geordnete Lipoproteinstruktur der Membranen aufgehoben, die Sekretgranula und die Zellmembran verlieren ihre physiologische Barrierefunktion. Sie werden für großmolekulare Komponenten permeabel. Die Spontanfreisetzung von Hormonen kann auf diese Weise sozusagen durch niedrige Temperaturen "induziert werden" (Hong und Poisner) (35).

3.3. Bestimmung der Gesamt-Opiataktivität im Bindungstest (Radiorezeptorassay)

Die Bestimmung der Opiataktivität im Radiorezeptorassay beruht auf der Verdrängung eines radioaktiv markierten Opiats oder Opiatantagonisten von den Rezeptorbindungsstellen durch die in einer Probe enthaltenen opiatartigen Substanzen. Die Quantifizierung der freigesetzten Opiataktivität erfolgt in Normorphin-Äquivalenten. Zur Herstellung Opiatrezeptoren enthaltender Homogenate wurden Ratten dekapitiert und deren Gehirn entnommen. Nach Entfernung des Kleinhirns - dieser Hirnteil enthält nur sehr wenige Opiatrezeptoren - wurde das Gehirn in 0.05 M eiskaltem Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) in einem Potter-Elvejhem-Homogenisator durch 10 Auf- und Abbewegungen bei 750 rpm

homogenisiert. Danach wurde das Homogenat mit Puffer auf eine Konzentration 1 : 100 (Gewebe/Puffer) verdünnt.

Die folgenden Schritte wurden jeweils in dreifachem Ansatz durchgeführt:
2 ml Homogenat wurde mit der unmarkierten Testsubstanz bei Zimmertemperatur (22 - 24°C) 5 Minuten lang vorinkubiert. Nach Zugabe des radioaktiv markierten Opiatantagonisten ^{3}H-Naloxon (spezifische Radioaktivität 20Ci/mMol, NEN Boston, USA, in einer Endkonzentration von 2,5 x 10^{-10} Mol im Ansatz) wurden die Proben unter vermindertem Druck durch Glasfaser filtriert (Whatman GF/B, Durchmesser 2,5 cm) und zweimal mit 10 ml eiskaltem Natriumphosphatpuffer nachgespült. In Zählgefäßen wurden die Filter mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Aqua Luma, Lumac, Belgien) 25 Stunden lang geschüttelt und anschließend die Radioaktivität im Szintillationszähler (Packard Tricarb 8890) mit einer Zählausbeute von 35-40% gemessen.

3.4. Extraktionsmethoden

3.4.1. Extraktion von ß-Endorphin aus Humanplasma

Je 10 ml venöses Blut wurde gesunden Müttern, deren Schwangerschaft ohne Komplikationen verlief und 38-42 Wochen dauerte, zu verschiedenen Zeiten während des Geburtsverlaufs entnommen (siehe 3.1.1.). Außerdem wurden Blutproben unmittelbar nach der Geburt aus der Nabelschnurvene entnommen. Zur Bestimmung der ß-Endorphin Normalwerte wurden 70 ml venöses Blut nicht schwangeren jungen Frauen entnommen. Sofort nach Abnahme wurden die Blutproben in eisgekühlte Zentrifugengläser überführt und mit ACD-Adenin-Lösung (Travenol^{R}) versetzt (1,5 ml/10 ml Blut), um die Gerinnung zu verhindern (ACD-Adenin enthält 1% Zitronensäure, 3% Natriumcitrat, 3% Glukose und 0,07% Adenin). Die Blutproben wurden sofort bei 4°C zentrifugiert

(1800 g für 5 Minuten), der Plasmaüberstand eingefroren und bei -30°C gelagert.

Wegen der geringen Konzentration des zu bestimmenden ß-Endorphins im Plasma von Kontrollpersonen mußte dieses aus dem Plasma extrahiert und konzentriert werden. Den aufgetauten Plasmaproben wurde Kieselsäure (gefällt, trocken, Fa. Merck) zugesetzt (50 mg/ml Plasma); diese Menge reichte aus, um zum Plasma zugesetztes synthetisches ß-Endorphin in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 ng-500 ng/ml quantitativ (d.h. zu mehr als 95%) zu binden. Nach kurzem Schütteln (5 Sekunden) wurde die Suspension 5 Minuten lang inkubiert und 5 Minuten lang bei 8000 g zentrifugiert. Der ß-Endorphin-freie Überstand wurde für die Extraktionsstandardkurve verwendet. Das ß-Endorphin-haltige Kieselsäuresediment wurde zweimal mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers und einmal mit Äther gewaschen. Anschließend wurde das adsorbierte ß-Endorphin mit dem eineinhalbfachen Volumen Aceton-0,1M HCL (80/20 Vol/Vol) von der Kieselsäure desorbiert. Der Aceton/HCL -Extrakt wurde nach Zentrifugation in einem Rotationsverdampfer evaporiert. Der Rückstand wurde in einem geeigneten Volumen des bei der radioimmunologischen Bestimmung (RIA) verwendeten Standardpuffers aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde dann der Gehalt an ir-ß-END in Aliquots des Überstandes direkt im RIA gemessen oder nach chromatographischer Trennung mittels Gelfiltration in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Zugabe von synthetischem ß-Endorphin (15-500 fmol/ml) zu ß-Endorphin-freiem Plasma (Plasma, in dem ß-Endorphin durch Kieselsäure entfernt wurde), gefolgt von der oben beschriebenen Extraktion, ergab eine Wiederfindungsrate von ca. 60%; Zugabe des mit dem RIA kreuzreagierenden ß-Lipotropins ergab eine Wiederfindungsrate von ca. 30%.

Wegen der hohen Konzentrationen von ß-Endorphin (und ACTH) im Plasma von Schwangeren und Neugeborenen während der Geburt konnte die radioimmunologische Bestimmung der Peptide in unextrahiertem Plasma durchgeführt werden. 0,1 ml Aliquots an unverdünntem Plasma wurden direkt für die ß-

Endorphinbestimmungen in den RIA eingesetzt. In diesem Fall wurden für die Aufstellung der Standardkurve Standardmengen (5-500 fmol) von synthetischem ß-Endorphin zu ß-Endorphin-freiem Plasma zugesetzt.

3.4.2. Extraktion von ß-Endorphin aus fötalen Hypophysen

Hypophysen von 22-24 Wochen alten Föten wurden ca. 2-4 Stunden nach der Fehlgeburt präpariert und unter einem Stereomikroskop in Vorderlappen und Mittel-Hinterlappen getrennt (die Hypophyse des Fötus enthält, im Gegensatz zum Neugeborenen, einen ausgeprägten Mittellappen). Die isolierten Vorder- und Mittel-Hinterlappen wurden in 1 ml 0,1 N HCL bei 95°C für 5 Minuten lang inkubiert, um die ß-Endorphin abbauenden Peptidasen zu inaktivieren. Nach Homogenisierung wurden die Proben zentrifugiert (1000 g x 15 Minuten). 10 ul des Überstandes wurden dann mit 1 ml RIA-Standardpuffer vermischt, die immunoreaktiven Komponenten des Extraktes mittels einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G-50) chromatographisch getrennt und im RIA gemessen. Die Wiederfindungsrate von ß-Endorphin (zum Hypophysengewebe vor der Extraktion zugegeben) war höher als 90%.

3.5. Trennung der ß-Endorphin-immunoreaktiven Komponenten in Humanplasma und Hypophysenextrakten durch Gelfiltration

Die Gelfiltration trennt Verbindungen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße. Das Packmaterial der Säulen enthält Partikel mit Poren von definiertem Durchmesser, in welche die Verbindungen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße eindringen. Die Retentionszeit ist demnach um so länger, je kleiner das Molekül ist.

Das für die radioimmunologische B estimmung verwendete ß-Endorphin-Antiserum erkennt nicht nur ß-Endorphin (Mol.Gew. 3500), sonder auch ß-Lipotropin (Mol.Gew. 10 000), das selbst keine Opiataktivität aufweist. Das unterschiedliche Molekulargewicht der beiden Peptide erlaubt ihre Trennung mittels Gelchromatographie.

Extrakte von Humanplasmen und Hypophysen von Föten wurden in einem Volumen von 1 ml/RIA-Puffer auf eine mit "Sephadex G-50 superfine" gefüllte Säule aufgetragen. Der Durchmesser der Säule betrug 0,9 cm, ihre Länge 95 cm, die Partikelgröße des Packmaterials betrug 10-40 µ. Die Proben wurden von der Säule bei 6°C mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/Stunde mit RIA-Puffer eluiert. 70 Fraktionen à 0,9 ml wurden gesammelt und von jeder Fraktion jeweils 2 x 350µl Aliquots im Doppelansatz auf den Gehalt an ß-Endorphin/ ß-Lipotropin im RIA getestet.

3.6. Radioimmunologische Bestimmungsmethoden

3.6.1. Radioimmunassay (RIA) für ß-Endorphin

Das Prinzip des RIA ist dem Radiorezeptorassay (3.3.) sehr ähnlich. Es beruht auf der Verdrängung von radioaktiv markiertem ß-Endorphin von spezifischen Antikörperbindungsstellen durch das in den Extrakten enthaltene ß-Endorphin. Die Entwicklung des ß-Endorphin RIA erfolgte in drei Schritten:

1. Gewinnung von spezifisch mit ß-Endorphin reagierenden Antikörpern.
2. Radioaktive Markierung von ß-Endorphin mit ^{125}Jod.
3. Entwicklung eines Verfahrens zur Trennung von an Antikörper gebundenem ß-Endorphin von freiem ß-Endorphin.

Zu 1) Zur Gewinnung von Antiseren wurde menschliches

ß-Endorphin kovalent an Rinder Thyroglobulin mittels eines Carbodiimid Derivatives (1-Äthyl-3-1-3-Dimethylaminopropyl)--Carbodiimid - wie bei Höllt und Mitarbeiter (34) beschrieben - gebunden. Das Konjugat wurde mit Freund'schem Adjuvans emulgiert und 100 µl Aliquots der Emulsion zwei jungen Neuseeland-Kaninchen (Gewicht 2000-2500 g) intradermal, auf viele Stellen verteilt, am Rücken injiziert. Die Anfangsdosis betrug 1,5 mg Thyroglobulin gekoppeltes ß-Endorphin. Nach drei Wochen und sechs Wochen wurde jeweils die Hälfte dieser Dosis nachinjiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurde den Tieren Blut entnommen, das Antiserum gewonnen und auf Spezifität im RIA getestet.
Zu 2) Die Herstellung radioaktiv markierten ß-Endorphins erfolgte durch Jodierung nach der Methode von Hunter und Greenwood (34). Zu 1 mCi Na^{125}-Jodid und 1 mMol human-ß--Endorphin, gelöst in 50 µl 0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5 wurden 20 µg Chloramin T (in 10 µl 0,05 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5) gegeben. Dies bewirkt die Oxydation des radioaktiven Jodids in ^{125}Jod, das sich an die aromatischen Seitengruppen der beiden Tyrosinaminosäuren des ß-Endorphins (Stelle 1 und 27) in para-Stellung kovalent bindet. Nach 30 Sekunden wurde die Reaktion durch das Reduktionsmittel Natriummetabisulfit (20µg in 10 µl Puffer) beendet. Danach wurde das ^{125}Jod markierte ß-Endorphin von nicht gebundenem ^{125}Jod durch Gelfiltration auf einer Bio-Gel P_4-Säule (innerer Durchmesser 1 cm, Länge 30 cm) getrennt. Die Elution erfolgte bei Zimmertemperatur mit 0,1n Essigsäure bei einer Geschwindigkeit von 25 ml/Stunde. Um Adsorption der kleinen Peptid- und Jodmengen an das Säulenmaterial zu verhindern, mußte die Säule zuvor mit Rinderserumalbumin (20 mg) beschickt werden.

Die ^{125}Jod-markiertes ß-Endorphin enthaltenden Fraktionen wurden mit dem gleichen Volumen von n-Propanol versetzt und bei -70°C gelagert. Diese Maßnahme verringerte die durch hohe radioaktive Markierung bedingte Selbstzer-

strahlung des ß-Endorphinmoleküls beträchtlich. Die angewandte Jodierungsmethode war sehr effizient, d.h. die spezifische Radioaktivität des ^{125}Jod-markierten Endorphins lag bei 8 Jodierungen zwischen 400 und 600 Ci/mMol oder 14,8-22,2 TBq/mMol. Da die Halbwertszeit des ^{125}Jods nur ca. 60 Tage beträgt, mußte alle 4 Wochen neu jodiert werden, um immer ^{125}Jod-markiertes ß-Endorphin mit hoher spezifischer Aktivität zur Verfügung zu haben.

Die Durchführung der ß-Endorphin RIA's erfolgte nach dem von Guillemin und Mitarbeitern (28) vorgeschlagenen Protokoll. Die Inkubationslösung bestand aus einem 0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4), dem 0,15 M NaCl, 0,01% Rinderserumalbumin, 0,1% Gelatine, 0,01% Thimerosal und 0,1% Triton X-100 zugesetzt wurden. Die Anwesenheit des nicht-ionischen Detergens Triton X-100 war von besonderer Wichtigkeit, da es die Adsorption des ß-Endorphins an die Wände der Reaktionsgefäße oder Pipetten verhinderte. Antiserum, ß-Endorphin-Standardlösungen und Extrakte wurden daher grundsätzlich mit diesem Puffer verdünnt.

In der Inkubationslösung (Endvolumen: 0,5 ml in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen) befanden sich 100 µl Antiserum, verdünnt 1 : 100 000, 50 µl Jod-125-ß-Endorphin (10 000 cpm = = 5-7 fmole), 50 µl Probe oder ß-Endorphin-Standardlösung und 300 µl RIA-Puffer.

Zu 3) Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden bei 4-6°C wurde die Probe mit einer Suspension versetzt, die 1% Aktivkohle und 0,5% Rinderserumalbumin im RIA-Puffer ohne Zusatz von Triton-X-100 enthielt. Die Aktivkohle hat die Eigenschaft, die kleineren Peptide, wie ß-Endorphin im Gegensatz zu größeren Proteinen bevorzugt zu binden. Durch Inkubation von 10 Minuten Dauer konnte das nicht gebundene ß-Endorphin in der Probe im Gegensatz zum makromolekularen ß-Endorphin-Antikörper-Komplex an die Aktivkohle gebunden werden. Nach Abzentrifugation der Aktivkohle wurden 800 µl des Überstandes,

der nur das Antikörper-gebundene ß-Endorphin enthielt, in Zählgefäße pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl Szintillationsflüssigkeit (Aqua Luma, Lumac, Belgien) wurde die Radioaktivität im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard 3390) mit einer Zählausbeute von 56% gemessen. Mit diesem RIA-Verfahren wurden die Antiseren der Kaninchen auf Titer, Spezifität und Sensitivität getestet.

Die beiden verwendeten Antiseren wiesen hohe Titer auf, das heißt, sie waren in der Lage, bei einer Verdünnung von 1 : 60 000 bis 1 : 100 000 50%, d.h. 5-7 fmole ^{125}Jod-markiertes ß-Endorphin zu binden. Das eine Antiserum hatte etwas höhere Sensitivität und wurde deshalb bei den RIA-Bestimmungen verwendet. Die Spezifität dieses Antiserums zeigt die Abb. 1.

Man sieht, dass nicht-markiertes ß-Endorphin bereits in sehr kleinen Konzentrationen in der Lage ist, ^{125}Jod-markiertes ß-Endorphin aus seiner Bindung an den Antikörpern zu verdrängen. Die Nachweisgrenze liegt hier bei etwa 5 fmole pro Inkubationsansatz. Eine ähnlich hohe Affinität zum Antiserum hat jedoch auch ß-Lipotropin, das die volle Aminosäuresequenz des ß-Endorphins an seinem C-terminalen Ende aufweist. Diese unerwünschte Kreuzreaktivität machte in vielen Fällen die gelchromatographische Trennung der immunoreaktiven Komponenten im Plasma und Gewebsextrakten notwendig. Dagegen war die Kreuzreaktion anderer ß-Endorphinfragmente wie des α-Endorphins (ß-Endorphin 1-16), des γ-Endorphins (ß-Endorphin 1-17) oder des Methionin-Enkephalins (ß-Endorphin 1-5) zu vernachlässigen. Ebensowenig wurden synthetisches Human-ACTH$_{1-39}$, sowie die ACTH-Fragmente 1-17 und 1-23 vom Antiserum erkannt. Nur aus Schweinehypophysen isoliertes ACTH$_{1-39}$ zeigte eine geringe Kreuzreaktion, vermutlich durch Verunreinigung durch Spuren von ß-Lipotropin oder ß-Endorphin.

3.6.2. Radioimmunassay für ACTH

In einem Teil der Plasmaproben der schwangeren Frauen wurde ACTH bestimmt. Die radioimmunologische Bestimmung wurde mittels eines käuflichen RIA-Kits durchgeführt ("Adrenocorticotropic Hormone RIA-Kit-CEA-Sorin", Salugia, Italien"). Im Inkubationsvolumen von 1 ml befanden sich: 100 µl ^{125}Jod-markiertes Schweine-$ACTH_{1-3}$ (6000 cpm), 100µl Schweine-$ACTH_{1-39}$-Antiserum, 100 µl Plasma oder Human-$ACTH_{1-39}$ als Standard und 700 µl Veronal-Puffer 0,02 M, pH 8,4 mit 0,2 % Mercaptoethanol. Nach einer Inkubationszeit von 48 Std. bei 2-6°C wurden 500 µl Kohle-Suspension (2% Aktivkohle im Veronal-Puffer) zugegeben, 5 Minuten lang inkubiert und 15 Minuten lang bei 25000 u zentrifugiert. Die Radioaktivität im Überstand wurde dann in einem γ-Zähler gemessen. Die Sensitivität des RIA-Kits betrug 10-12 fmole pro ml Plasma. Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität von α-MSH (N-Acetyl 1-13 $ACTH-NH_2$), Human-ß-Lipotropin und ß-Endorphin im ACTH-RIA getestet. Es zeigte sich, dass alle diese Peptide vom ACTH-Antiserum des Kits nicht erkannt wurden.

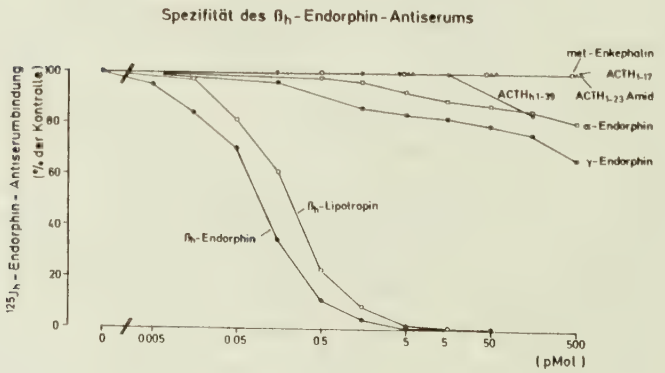

Abb. 1 Kreuzreaktivität des ß-Endorphin-Antiserums mit anderen Peptidfragmenten

4. ERGEBNISSE

4.1. Nachweis von ß-Endorphin im Plasma von nichtschwangeren weiblichen Kontrollpersonen

Im Plasma von jungen, nichtschwangeren Frauen wurden geringe Mengen von ir-ß-END gefunden (Abb. 3a). Der Gehalt liegt zwischen 6-15 fmol/ml Plasma. Nach Auftrennung der immunoreaktiven Komponenten durch Gelfiltration ließ sich sowohl ß-Lipotropin als auch ß-Endorphin nachweisen (Abb. 5a). Beide Peptide waren etwa in gleichen Anteilen vorhanden. Der relative Anteil des immunoreaktiven ß-Lipotropins war etwas größer als der des immunoreaktiven ß-Endorphins.

4.2. Konzentrationen von ß-Endorphin im Plasma von schwangeren Frauen unter Oxytocin-Infusion

Am errechneten Geburtstermin (oder danach bis zur 42. Woche), aber vor Eintritt der Wehentätigkeit wurde ir-ß-END im Plasma von 7 Frauen bestimmt. Es zeigten sich gegenüber der Gruppe nichtschwangerer Frauen deutlich erhöhte Spiegel (Abb. 2a).

Da bei diesen Frauen zur Testung der Wehenbereitschaft des Uterus ein Oxytocin-Belastungstest vorgenommen wurde (siehe Methodik), wurde bei denselben Patientinnen vor, während und nach der Gabe von Oxytocin (Orasthin^{R}) ir-ß-END im Plasma bestimmt. Eine Stimulierung an ir-ß-END durch Oxytocin im Sinne einer vermehrten Freisetzung konnte nicht nachgewiesen werden, eher eine Tendenz zur erniedrigten ir-ß-END Plasma-Konzentration (Abb. 2b). Nach der 20 Minuten langen Oxytocin-Infusion stieg der Gehalt an den immunoreaktiven Komponenten leicht an (Abb. 2c). Der gepaarte Student's t-Test ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten. Dies legt den Schluß nahe, daß

Oxytocin auf die Freisetzung von ir-ß-END keinen nennenswerten Einfluß hat.

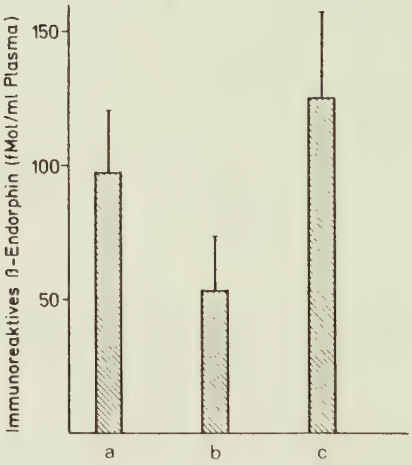

Abb. 2 Konzentrationen von immunoreaktivem ß-Endorphin im Plasma von schwangeren Frauen unter Oxytocin-Infusion

a) Vor Oxytocin-Infusion
b) Nach Ende der 20 Minuten langen Oxytocin-Infusion (6 I.E.)
c) 1 Stunde nach Oxytocin-Infusion

Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 Schwangeren
0,1 ml Plasma Aliquots wurden ohne Extraktion direkt im RIA gemessen.
Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft, der Test ergab jedoch keine Signifikanz der einzelnen Werte gegenüber dem Wert vor der Infusion.

4.3. Plasmakonzentrationen von ACTH und ß-Endorphin während der Normalgeburt

In venösen Blutproben bei Mutter und Kind wurde der Gehalt an ir-ß-END und ACTH im nicht extrahierten Plasma mittels RIA gemessen. Blutproben acht nichtschwangerer Frauen dienten als Kontrollwerte.

4.3.1. ß-Endorphin im mütterlichen Plasma und im Plasma der Neugeborenen

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, findet man während der Eröffnungsphase und der Austreibungsphase signifikant erhöhte Werte von ir-ß-END im Plasma von Schwangeren (Abb. 3b, c, d, e) im Vergleich zu den nichtschwangeren Kontrollen (Abb. 3a). Einen Tag post partum (Abb. 3f) waren für ir-ß-END signifikant niedrigere Werte zu beobachten. Im Vergleich zu der Eröffnungsperiode ergibt sich eine Erhöhung der ß-Endorphinwerte in der Austreibungsphase (Abb. 3d, e versus b, c). Innerhalb der Eröffnungsphase waren die Konzentrationen von ir-ß--Endorphin während der Wehenpause (Abb. 3c) niedriger als die während der Wehenkontraktion (Abb. 3b); dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zu den Endorphinspiegeln nichtschwangerer weiblicher Kontrollpersonen (Abb. 3a) findet man auch deutlich erhöhte Peptidkonzentrationen im Nabelvenenplasma der Neugeborenen (Abb. 3g).

Im Nabelvenenplasma der Neugeborenen wurden ähnlich hohe ir-ß-END-Werte beobachtet, wie im Plasma der Mütter während der Geburt (Abb. 3g versus 3b, c, d, e). Im Vergleich zu den Endorphinspiegeln nichtschwangerer Kontrollpersonen (Abb. 3a) liegen die Peptidkonzentrationen im Nabelvenenplasma der Neugeborenen signifikant höher (Abb. 3g).

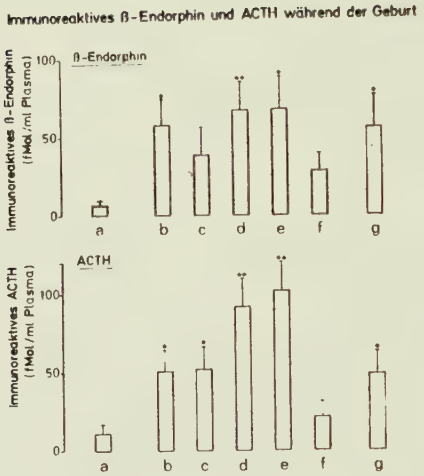

Abb. 3 Plasmakonzentrationen von immunoreaktivem ß-Endorphin und ACTH während der Normalgeburt

a) Im Plasma von nichtschwangeren weiblichen Kontrollpersonen

b) Im mütterlichen Plasma in der Eröffnungsphase während der Wehe

c) Im mütterlichen Plasma in der Eröffnungsphase während der Wehenpause

d) Im mütterlichen Plasma in der Austreibungsphase während der Wehe

e) Im mütterlichen Plasma in der Austreibungsphase während der Wehenpause

f) Im mütterlichen Plasma 1 Tag post partum

g) Im Plasma der Nabelvene des Neugeborenen

Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasmakonzentrationen von 18 Geburten

Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft und gegenüber der Kontrolle in der Abbildung dargestellt.

* $p < 0{,}05$ ** $p < 0{,}01$

0,1 ml Plasma Aliquots wurden ohne Extraktion direkt im RIA gemessen.

4.3.2. ACTH im mütterlichen Plasma und im Plasma des Neugeborenen

Ebenfalls erhöht sind die Werte an immunoreaktivem ACTH im Plasma von Gebärenden (Abb. 3b, c, d, e) im Vergleich zu nichtschwangeren weiblichen Kontrollpersonen (Abb. 3a). Einen Tag post partum gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied mehr (Abb. 3 f) zwischen den Peptidgehalten der Wöchnerinnen im Vergleich zu Nichtschwangeren. Wie bei den ß-Endorphingehalten (siehe 4.3.1.) ergibt sich in der Austreibungsphase eine Erhöhung der ACTH-Werte (Abb. 3d, e) im Vergleich zu der Eröffnungsphase (Abb. 3b, c). Zwischen Wehenkontraktion und Wehenpause läßt sich für ACTH dagegen kein Unterschied in den Plasmaspiegeln nachweisen (Abb. 3c versus b).

In der Nabelvene der Neugeborenen waren ebenfalls hohe ACTH-Gehalte zu beobachten. Sie lagen in derselben Größenordnung, wie bei den Müttern (Abb. 3g versus 3b, c, d, e). Im Vergleich zu den ACTH Spiegeln nichtschwangerer Frauen findet man erhöhte Peptidkonzentrationen im Nabelvenenplasma der Neugeborenen (Abb. 3g).

4.3.3. ß-Endorphin im Nabelarterien- und Venenplasma der Neugeborenen

In einer weiteren Serie von Untersuchungen wurden die Plasmaspiegel an ir-ß-END im Moment der Geburt im venösen Plasma der Mütter bestimmt und mit denen im venösen und arteriellen Plasma des Kindes verglichen. Wie Abb. 4 zeigt, sind die Plasma ß-Endorphinwerte im mütterlichen Plasma signifikant höher als im kindlichen Plasma. Zwischen den ir-ß-END-Konzentrationen aus der Nabelschnurarterie und aus der Nabelschnurvene besteht dagegen kein Unterschied (Abb. 4b versus c).

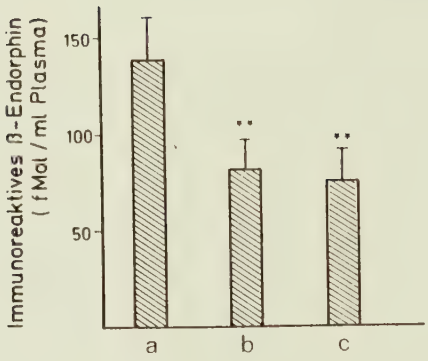

Abb. 4 Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma der Mütter im Vergleich zum Nabelschnurvenen- und Arterienplasma der Neugeborenen

a) Im Plasma der Mütter unmittelbar nach der Entbindung
b) Im Plasma der Nabelvene der Neugeborenen
c) Im Plasma der Nabelarterie der Neugeborenen

Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasmabestimmung von 12 Geburten

Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft und gegenüber den Plasmawerten der Mütter in der Abbildung dargestellt.

* $p < 0{,}05$ ** $p < 0.01$

0,1 ml Plasma Aliquots wurden ohne Extraktion direkt im RIA gemessen.

4.3.4. Bestimmung der ß-Endorphin immunoreaktiven Komponenten im Plasma

Wegen der vollständigen Kreuzreaktivität des ß-Endorphin-Antiserums mit ß-LPH war es notwendig, die beiden immunoreaktiven Komponenten weiter aufzutrennen. Dies erfolgte durch Gelfiltration (siehe Methodik). Die Fraktionen wurden im RIA im Doppelansatz getestet und die Gehaltswerte auf die Wiedergewinnungsrate von ß-LPH und ß-Endorphin nach SiO_2-Extraktion korrigiert.

Die Extraktion des Plasmas von nichtschwangeren Frauen (Abb. 5a) ergab niedrige Gehaltswerte für beide Komponenten, die Menge von ß-LPH war im Vergleich zum ß-Endorphin etwas höher (vgl. 4.1.). Verglichen damit waren erhöhte Werte der beiden Komponenten im Plasma von Gebärenden in der Preßphase (Abb. 5b) zu beobachten, wobei der ß-Endorphin-Anteil überwog.

Die Plasmaextrakte aus der Nabelvene (Abb. 5c) und aus der Nabelarterie (Abb. 5d) enthalten etwas geringere Mengen sowohl von ß-LPH als auch von ß-Endorphin, als in Abb. 5b für die Mutter zu beobachten war. Im fötalen Blutkreislauf fließt das Blut von der Plazenta durch die Nabelvene zum Fötus hin und durch die Nabelarterie zur Plazenta zurück. Nach der vorliegenden Untersuchung weist das Nabelvenenplasma im Vergleich zur Nabelarterie einen höheren Gehalt an ß-Endorphin auf (Abb. 5c). Dieses Ergebnis weist auf einen eventuellen plazentaren Ursprung von ß-Endorphin hin.

4.4. Nachweis von ß-Endorphin und ß-Lipotropin in Vorder- und Mittellappen fötaler Hypophysen

Die Extraktion und Fraktionierung von fötalen Hypophysen in der 22. Schwangerschaftswoche ergab etwa gleiche Mengen von ß-Endorphin und ß-LPH sowohl für den Vorder-

lappen, als auch für den Zwischen-Hinterlappen (Abb. 5e, f). Die menschliche Hypophyse synthetisiert also ß-Endorphin und ß-Lipotropin schon während der fötalen Entwicklung. Die Elutionsprofile (Abb. 5e, f) repräsentieren 1% des fötalen Peptidgehaltes.

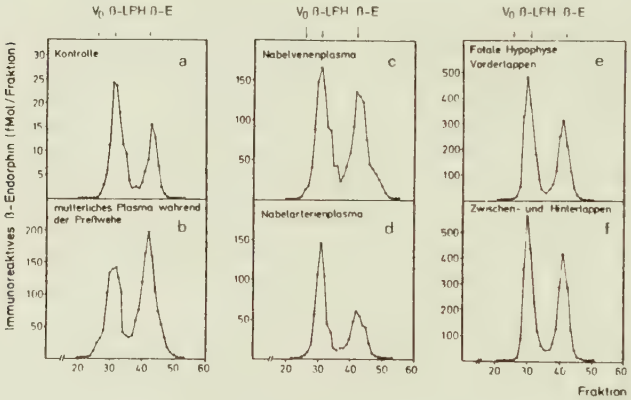

Abb. 5 Trennung der ß-Endorphin-immunoreaktiven Komponenten in Plasma und Hypophysenextrakten mittels Gelfiltration (Sephadex G50 SF)

Immunoreaktives ß-Endorphin in Extrakten von jeweils 30 ml Plasma und von Hypophysenextrakten (entsprechend 1% des Gesamtgewebes) wurde mittels analytischer Sephadex G50-Säulen chromatographiert und immunreaktives ß-Endorphin in den einzelnen Fraktionen bestimmt, wie im methodischen Teil beschrieben. Die Säulen wurden kalibriert mit Dextranblau ($=V_O$), mit ß-Lipotropin (ß-LPH) und ß-Endorphin (ß-E).

a) Mischplasma von 10 nichtschwangeren weiblichen Kontrollpersonen
b) Mischplasma von 10 Gebärenden während der Preßwehe
c) Nabelvenen-Mischplasma von 10 Neugeborenen
d) Nabelarterienmischplasma von 10 Neugeborenen
e) Hypophysen-Vorderlappen eines 22 Wochen alten Föten
f) Hypophysen-Zwischen-Hinterlappen eines 22 Wochen alten Föten

Die unterschiedliche Wiederfindungsrate für ß-Lipotropin und ß-Endorphin wurde berücksichtigt bei der Kalkulation der Mengen der einzelnen Peptidkomponenten.

4.5. ß-Endorphin-Spiegel im mütterlichen Plasma und im Plasma der Neugeborenen unter besonderen Geburtsbedingungen

4.5.1. Bei schmerzfreier Geburt (unter Epiduralanästhesie)

Um die wichtige Frage zu untersuchen, inwieweit der durch die Wehentätigkeit und die Geburt ausgelöste Schmerz die Freisetzung des ß-Endorphins bewirkt, untersuchten wir die Plasmaspiegel von 12 Gebärenden, die während der Entbindung unter epiduraler Anästhesie (EDA) standen. Die Spiegel an ir-ß-END in der Eröffnungsphase vor dem Anlegen der Epiduralanästhesie (Abb. 6a) waren ähnlich hoch, wie nach der Einleitung der Epiduralanästhesie (Abb. 6b). Unter voll wirksamer Epiduralanästhesie war keine Erhöhung des ir-ß-END in der Preßphase zu beobachten (Abb. 6c) im Gegensatz zu den Normalgeburten ohne EDA (Abb. 3). Einen Tag post partum waren die ir-ß-END-Konzentrationen der Mütter niedrig (Abb. 6d). Im Nabelvenenplasma waren die Werte ähnlich hoch (Abb. 6e), wie bei Geburten ohne Epiduralanästhesie (Abb. 3).

4.5.2. Operative Schnittentbindung

Es stellte sich die Frage, ob die erhöhten ß-Endorphinspiegel während vaginaler Entbindung auch bei Frauen gefunden werden, die sich einer Kaiserschnitt-Operation unterzogen. Um das zu überprüfen, wurden in den verschiedenen Stadien vor und während des Kaiserschnitts Blutproben abgenommen und auf ir-ß-END getestet.

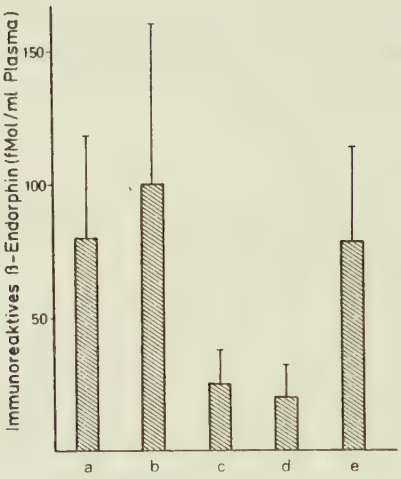

Abb. 6 Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma während schmerzfreier Geburt (unter Epiduralanästhesie = = EDA)

5 ml Plasma-Aliquots wurden mittels Kieselsäure extrahiert und der Gehalt an immunoreaktivem ß-Endorphin bestimmt, wie im methodischen Teil beschrieben.

a) Im mütterlichen Plasma in der Eröffnungsphase während der Wehe

b) Im mütterlichen Plasma in der Eröffnungsphase während der Wehe nach angelegter EDA

c) Im mütterlichen Plasma in der Austreibungsphase während der Wehe

d) Im mütterlichen Plasma 1 Tag post partum

e) Im Plasma der Nabelvene des Neugeborenen

Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasmakonzentrationen von 12 Geburten

Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft; der Test ergab jedoch keine Signifikanz der einzelnen Werte gegenüber dem post partum-Wert.

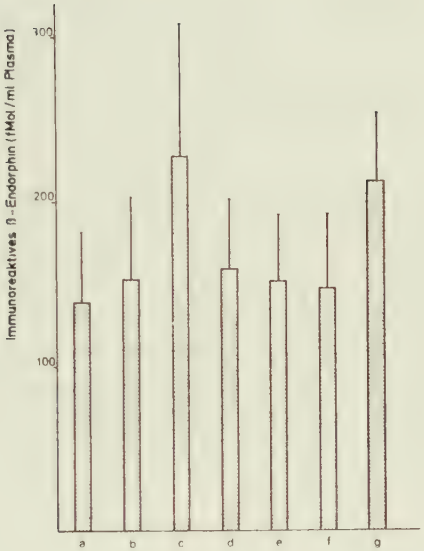

Abb. 7 Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma während operativer Schnittentbindungen

a) Im mütterlichen Plasma vor der Einleitung der Narkose (preoperativ)

b) Im mütterlichen Plasma 5 Minuten nach Einleitung der Narkose (intraoperativ)

c) Im mütterlichen Plasma vor der Entbindung (im Moment des operativen Eingriffs)

d) Im mütterlichen Plasma 10 Minuten nach der Entbindung

e) Im mütterlichen Plasma 1 Stunde postoperativ

f) Im mütterlichen Plasma 1 Tag postoperativ

g) Im Plasma der Nabelvene des Neugeborenen

Mittelwerte und Standardabweichungen von 11 Schnittentbindungen

Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft; der Test ergab jedoch keine Signifikanz der einzelnen Werte gegenüber dem preoperativen Wert.

o,1 ml Plasma-Aliquots wurden ohne Extraktion direkt im RIA gemessen.

Während der Narkose und während des operativen Eingriffs lagen die ir-ß-END-Gehaltswerte sogar höher als bei Normalgeburten (Abb. 7a-e). Im Moment des operativen Eingriffs (Abb. 7c) war eine geringfügige Erhöhung der Plasma ir-ß-END zu beobachten; der gepaarte Student's t-Test ergab jedoch keine Signifikanz für diesen Wert. Für diese Erhöhung an ir-ß-END könnten die Narkose und der Operationsstress verantwortlich sein. Ein Tag postoperativ ist keine Senkung des ir-ß-END zu verzeichnen; dafür könnte die Medikation und die Wundheilung verantwortlich sein. Während des gesamten Operationsablaufes wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien registriert. Im fötalen Kreislauf wurden ebenfalls, ähnlich wie bei der vaginalen Entbindung, hohe Konzentrationen an ir-ß-END gefunden (Abb. 7g).

4.6. Plasma ß-Endorphin-Spiegel bei Curettage-Operationen

Da die Erweiterung des Muttermundes einen mechanischen Stimulus darstellt, sollte an nichtschwangeren Patientinnen geprüft werden, ob die Dehnung des Muttermundes Einfluß auf die Freisetzung von ß-Endorphin hat.

Wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, weist das ir-ß-END im Plasma niedrigere Gehaltswerte auf, als bei schwangeren Patientinnen. Weder unter alleiniger Anästhesie (Abb. 8a, b), noch unter Anästhesie und Operation (Abb. 8c, d) war eine Erhöhung des ir-ß-END zu beobachten. Ein Tag nach der Operation (Abb. 8e) lag das ir-ß-END im Plasma in derselben Höhe; möglicherweise ist hierfür die Medikation und die Wundheilung verantwortlich zu machen.

4.7. Plasma ß-Endorphin-Spiegel während des Stillens

4 Tage nach Entbindung wurde im Plasma von 12 Wöchnerinnen während des Stillens und 1 Stunde nach dem Stillen

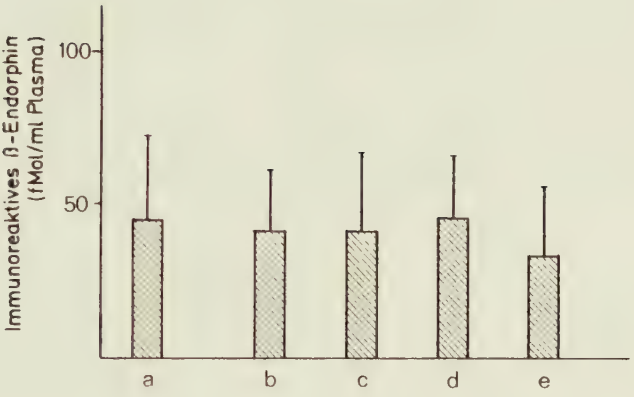

Abb. 8 Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma während diagnostischer Curettage-Operationen

a) Im Plasma der Patientinnen vor der Einleitung der Narkose

b) Im Plasma der Patientinnen 5 Minuten nach der Einleitung der Narkose

c) Im Plasma der Patientinnen bei Cervix-Dilatation (im Moment des operativen Eingriffs)

d) Im Plasma der Patientinnen 20 Minuten nach Narkose

e) Im Plasma der Patientinnen 1 Tag postoperativ

Mittelwerte und Standardabweichungen von 13 Curettage-Operationen
Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft; der Test ergab jedoch keine Signifikanz der einzelnen Werte gegenüber dem preoperativen Wert.
0,1 ml Plasma-Aliquots wurden ohne Extraktion direkt im RIA gemessen.

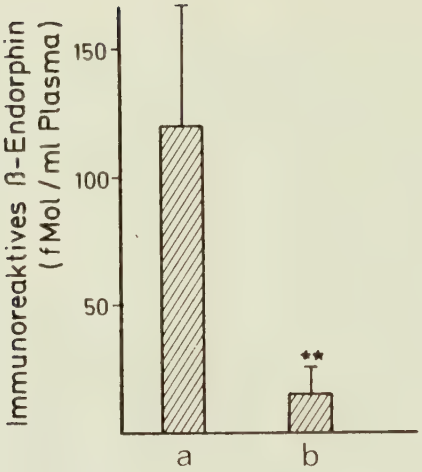

Abb. 9 Immunoreaktives ß-Endorphin im Plasma von Wöchnerinnen während des Stillens 4 Tage nach der Entbindung.

5 ml Plasma-Aliquots wurden mittels Kieselsäure extrahiert und der Gehalt an immunoreaktivem ß-Endorphin bestimmt, wie im methodischen Teil beschrieben.

a) Im mütterlichen Plasma während des Stillens

b) Im mütterlichen Plasma in der Stillpause (1 Stunde nach Entnahme der Probe a)

Mittelwerte und Standardabweichungen von 12 stillenden Müttern

Die Signifikanz wurde mit dem gepaarten Student's t-Test geprüft und gegenüber dem Stillwert in der Abbildung dargestellt.

** $p < 0,01$

0,1 ml Plasma-Aliquots wurden ohne Extraktion direkt im RIA gemessen.

ir-ß-END bestimmt. Wie Abb. 9 zeigt, waren während des Stillens höhere, in der Stillpause dagegen signifikant niedrigere Werte zu beobachten. Das ir-ß-END in der Stillpause betrug nur 12,6% des Gehalts während des Stillens.

4.8. In vitro-Freisetzung von Opioid-aktiven Substanzen aus Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen

Um zu prüfen, ob das Peptidhormon Oxytocin die hypophysäre Freisetzung von Endorphinen in vitro in physiologischen Konzentrationen (10^{-9}Molar) bzw. in erhöhten Konzentrationen (10^{-6}Molar) beeinflußt, wurden Kontrollversuche vorgenommen. Das zerkleinerte Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen wurde bei 37°C 17 Minuten lang superfundiert (siehe Methodik). Die während dieser Zeit freigesetzte Menge an Opiataktivität betrug 20-50pMol Normorphinäquivalente pro Vorderlappen. Nach der Vorinkubationsperiode wurden die Inkubationsansätze 8 Minuten lang mit Ringerlösung, die Oxytocin (10^{-9} bzw. 10^{-6}Molar) enthielt, superfundiert. Wie aus der Abb. 10 zu ersehen ist, wurde dadurch die Freisetzung der Opioid-aktiven Substanzen während der Inkubation und 10 Minuten danach nicht signifikant verändert. Anschließende 10 Minuten lange Inkubation der Vorderlappen bei 0°C resultierte in der Freisetzung von 0,9-1,25 mMol normorphinäquivalenter Opiataktivität pro Vorderlappen. Der größte Teil der freisetzbaren Opioide blieb also während der Inkubation bei 37°C gespeichert, d.h. die Sekretgranula blieben intakt während der 37°C Inkubation. Kontrollversuche zeigten, daß Oxytocin allein die Bindung der Endorphine an den Rezeptor nicht beeinflußt.

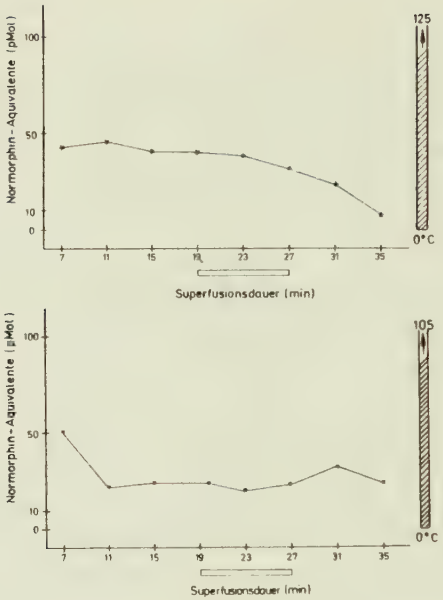

Abb. 10 Freisetzung von opiat-aktivem Material aus Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen in vitro

Zerkleinertes Gewebe von 80 Hypophysen-Vorderlappen wurde mit KRB-Lösung bei 37°C superfundiert. Das Superfusat wurde im RRA auf Opiat-Aktivität getestet und in Normorphinäquivalenten per Hypophysen-Vorderlappen (HVL) ausgedrückt. Nach 19-minütiger Vorinkubationszeit wurde dem Inkubationsmedium 10^{-6}Mol. (obere Abbildung) bzw. 10^{-9}Mol. (untere Abbildung) Oxytocin zugesetzt und 8 Minuten lang superfundiert (siehe Querbalken unter der Abszisse). Am Ende der 35 Minuten langen Superfusionszeit bei 37°C wurde das HVL-Gewebe mit eiskalter Ringer-Lösung (0°C) 10 Minuten lang weiter superfundiert und die freigesetzte Menge an opiat-aktivem Material im RRA gemessen (schraffierte Längsbalken).

5. DISKUSSION

Guillemin und Mitarbeiter haben gezeigt, dass unter verschiedenen Stressbedingungen bei Ratten das opiatartig wirkende Peptid ß-Endorphin zusammen mit dem corticotropen Peptid ACTH aus der Hypophyse in die Blutbahn ausgeschüttet wird (27).

Auf der Suche nach geeigneten Stressbedingungen beim Menschen wählten wir für unsere Untersuchungen die perinatale Periode aus, die sowohl für die Mutter als auch für das zu gebärende Kind einen starken physiologischen Stress darstellt. Während der Schwangerschaft und Geburt kommt es bekanntlich bei Mensch und Tier zu einer Vielzahl von physiologischen Veränderungen und Anpassungsvorgängen. Dem endokrinen System kommt dabei zur Aufrechterhaltung und Steuerung von Schwangerschaft und Geburt eine herausragende Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit wird der Nachweis der Freisetzung der Peptidhormone ß-Lipotropin und ß-Endorphin hinsichtlich antinociceptiver und hormoneller Wirkungen diskutiert.

Zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchungen (1978) lagen Berichte vor über das Vorkommen von ß-LPH im Plasma von gesunden unbehandelten Individuen, nicht aber über das Vorkommen von ß-Endorphin im menschlichen Plasma (Suda et al., 1978; Krieger et al., 1977; Wiedemann et al., 1977) (78, 45, 84). Diese Befunde sind inzwischen widerlegt worden und lassen sich durch geringe Reaktivität der verwendeten Antiseren mit ß-Endorphin im Vergleich zu ß-LPH erklären. Beim Menschen war bis dahin eine spontane oder stressinduzierte Freisetzung von ß-Endorphin nicht gezeigt worden. In der Zwischenzeit haben jedoch mehrere Gruppen immunologisch ß-Endorphin im normalen menschlichen Plasma nachgewiesen (Akil et al.; Höllt et al.; Wardlaw und Frantz; Nakao et al.) (1, 32, 33, 81, 60). Insbesondere Höllt und Nakao zeigten, daß ß-Endorphin beim

Menschen im Blutplasma vorhanden ist und die nachgewiesenen ß-Endorphin-Werte nicht artifiziell durch ß-LPH-Abbau während des Extraktionsverfahrens entstehen.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß bei nichtschwangeren jungen Frauen neben ß-Lipotropin auch meßbare ß-Endorphinmengen nachzuweisen sind. Die bei Gebärenden nachgewiesenen erhöhten Mengen von ir-ß-END lagen in der Größenordnung von 50-160 fmol/ml Plasma. Ebenfalls erhöhte Gehalte an immunoreaktivem ß-Endorphin haben Akil et al. (1) in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nachgewiesen; die Werte liegen in der Größenordnung von 61 ± 10 fmol/ml Plasma und stammen von schwangeren Frauen des letzten Trimenons der Schwangerschaft.

Da die erste Blutprobe in der Geburtsserie nach bereits angelegter Oxytocin-Infusion entnommen wurde (s. 3.1.1.), mußte geprüft werden, ob die bei der Geburt beobachteten hohen ir-ß-END Plasmakonzentrationen nicht etwa das Resultat einer Oxytocin-induzierten Freisetzung sind. Während der Geburt beim Menschen sind allgemein physiologisch erhöhte Konzentrationen von Oxytocinaktivität zu finden (Armstrong und Stewart) (4), wogegen bei nichtschwangeren Frauen im Plasma keine Oxytocin-Aktivität zu finden war. Eine geringe Corticotropin-Freisetzungsaktivität durch Oxytocin ist bekannt (Doepfner et al.) (17); dieser Effekt ist aber sehr niedrig und unspezifisch im Vergleich zu der starken Corticotropin-Freisetzungsaktivität von anderen neurohypophysären Peptidhormonen - wie Arg.- und Lys.-Vasopressin und ihren synthetischen Peptidderivaten.

Um eine eventuelle Freisetzung von ß-Endorphin durch das routinemäßig infundierte Oxytocin zu untersuchen, wurde ir-ß-END im venösen Plasma von schwangeren Frauen in der 42. Woche der Schwangerschaft bestimmt. Hierbei wurde die Wehenbereitschaft der Uteri getestet. Auf die von Oxytocin induzierten Wehen folgte keine Entbindung. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, hat Oxytocin bei Wehenindukt-

tion während der 20 Minuten langen Infusionsperiode und danach keine signifikante Erhöhung der ß-Endorphin-Freisetzung induziert.

Die Freisetzung hypophysärer Endorphine durch Oxytocin unter physiologischen Bedingungen wurde auch in in vitro-Experimenten untersucht (Abb. 10). Physiologische Konzentrationen von Oxytocin (10^{-9}M) und erhöhte Konzentrationen von (10^{-6}M) hatten die Spontanfreisetzung von Endorphinen aus zerkleinertem Vorderlappengewebe von Schweinehypophysen während der 8 Minuten langen Superfusionsperiode nicht erhöht. Diese Befunde unterstützen die Annahme, daß die bei der Geburt beobachteten hohen Werte von ir-ß-END im Plasma nicht das Ergebnis einer Oxytocin-induzierten Ausschüttung hypophysärer Endorphine darstellen.

Eine Erhöhung des Peptidhormons ACTH im Plasma von Frauen während der Geburt ist schon länger bekannt (Allen et al.; Jouppila et al.; Kauppila et al.; Rees et al.; Winters et al.) (2, 40, 43, 69, 85). Erhöhte Plasma-ACTH-Konzentrationen bei Mutter (47 fmol/ml Plasma) und Neugeborenem (50 fmol/ml Plasma) wurden auch von Allen gefunden. Diese Peptidkonzentration ist vergleichbar mit den durch Stress stimulierten ACTH-Plasma--Werten (57 fmol/ml Plasma), wogegen die normalen Kontrollwerte um 0,5-2,5 fmol/ml Plasma) lagen (Allen et al.) (2).

Während der Stressituation Geburt wurden die Konzentrationen von ir-ß-END und ACTH sowohl im mütterlichen Plasma als auch im Neugeborenenplasma signifikant über die Kontrollwerte nichtschwangerer junger Frauen erhöht (Abb. 3). Während der Austreibungsphase war im mütterlichen Plasma signifikant mehr ACTH zu finden als in der Eröffnungsphase (Abb. 3). Dieser Befund stimmt überein mit den Befunden von Kauppila et al. (43). Zwischen den Wehen und den Wehenpausen bei den beschriebenen kurzen Abnahme-Intervallen (1 - 3 Minuten) waren im Plasma-ACTH-Gehalt keine Unterschiede festzustellen (Abb. 3b versus c und d versus e). Während der Eröffnungspause der Eröffnungsphase fanden wir dagegen

niedrige ir-ß-END Plasma KOnzentrationen (Abb. 3c). Dieser Befund könnte dadurch geklärt werden, daß ß-Endorphin und ß-LPH im Gegensatz zu ACTH schneller aus der Blutbahn eliminiert werden. So wurden für ß-LPH eine höhere clearance-Rate als für ACTH beschrieben (Liotta et al.) (50).

Für ß-Endorphin/ß-LPH im mütterlichen Plasma wurden die höchsten Werte unmittelbar nach der Geburt gefunden. Dafür könnte der extreme Stress des Geburtsvorgangs verantwortlich sein (Abb. 4a). Unmittelbar nach der Entbindung wurden für ß-Endorphin/ß-LPH sehr hohe Werte auch im Plasma der Neugeborenen gefunden, obwohl diese Werte für beide Peptidhormone signifikant niedriger lagen, als die Gehaltswerte der Mütter (Abb. 4b und c versus a). Als Quelle für ß-Endorphin/ß-LPH im Plasma des Neugeborenen könnte die fötale Hypophyse, die Plazenta, die mütterliche Hypophyse oder deren Kombination in Frage kommen. Wäre das ß-Endorphin/ß-LPH im Plasma des Neugeborenen mütterlichen Ursprungs, so müßte es per Diffusion durch die Plazenta vom mütterlichen in den fötalen Kreislauf gelangen. Dies gilt für Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 600 (Moya und Thorndike; Migeon et al.) (57, 56). Bei einem Molekulargewicht über 600 müßten allerdings aktive Transportmechanismen eingeschaltet werden. Allen et al. (2) und Winters et al. (85) hatten wahrscheinlich gemacht, daß ACTH die Plazentaschranke nicht passiert. Bei Müttern mit Hypophysentumoren (Nelson-Tumor) lagen die erhöhten ACTH-Plasma-Spiegel vierfach höher als ACTH-Spiegel in der Nabelvene des Neugeborenen im Gegensatz zu denen gesunder Mütter, bei denen zwischen den mütterlichen und kindlichen ACTH-Plasma--Konzentrationen nur geringfügige Unterschiede zu verzeichnen waren. Da ACTH (Molekulargewicht 4500) die Plazenta-Schranke nicht passiert, ist anzunehmen, daß Peptide wie ß-Endorphin (Molekulargewicht 3500) und ß-LPH (Molekulargewicht 10 000) es auch nicht tun.

Rees at al. (69) nahmen an, dass das während der Geburt erhöhte ACTH des mütterlichen Plasmas nicht nur aus der Hypophyse

stammt, sondern auch aus der Plazenta ausgeschüttet wird. Er hat in der Plazenta große Mengen von ACTH gefunden. Für die plazentale Synthese des Peptids gibt es aber noch keinen Beweis, da die nachgewiesenen Konzentrationen zirkulationsbedingte Mengen darstellen könnten. Über den immunochemischen Nachweis von ß-Endorphin und ß-LPH in der Plazenta berichteten Gennazani et al. (22), Nakai et al. (58), Houck et al. (37) und Odagiri et al. (63). Durch Trennung der ß-Endorphin-immunoreaktiven Komponenten wurde auch das gemeinsame Vorläufermolekül von ACTH und ß-LPH radioimmunologisch nachgewiesen und eine eventuelle plazentale Synthese dieser Peptide angenommen. Über den immunohistochemischen Nachweis von ß-Endorphin/ß-LPH ist bis jetzt noch nicht berichtet worden. Andererseits berichteten Juillard et al. (41) über ein ß-Endorphin-immunoreaktives Material, das aus der Plazenta extrahiert wurde und nach mehreren Reinigungsschritten und darauffolgender Elektrophorese als die schwere Kette des Immunoglobulins IGG_1 identifiziert wurde. Das Peptid weist Homologien in der Aminosäuresequenz zu der Sequenz von ß-Endorphin auf. Das weist darauf-hin, dass die großmolekularen ß-Endorphin-immunoreaktiven Komponenten, die von Odagiri et al. (63) und Houck et al. (37) aus plazentalem Gewebe isoliert wurden, nicht das gemeinsame Vorläufermolekül von ACTH und ß-LPH darstellen, weiterhin, dass die immunochemische Reaktion einer Substanz kein Beweis für die chemische Identität des Liganden ist. Dieser Befund spricht ebenfalls gegen eine plazentale Synthese von ß-Endorphin/ß-LPH.

Obwohl eine Ausschüttung von ß-Endorphin/ß-LPH aus der Plazenta nicht ausgeschlossen werden kann, deuten unsere Befunde daraufhin, dass der größte Teil des ir-ß-END des Neugeborenenplasmas durch die Hypophyse des Kindes sezerniert wird (Abb. 5e, f).

Die Existenz fötaler Endorphine (Garcin und Coyle)(19) und Opiatrezeptoren (Clendennin et al.) (12, 13) wurde im Gehirn

von Ratten ab dem zweiten Trimester der Trächtigkeit nachgewiesen: die Konzentrationen steigen bis zum Zeitpunkt der Geburt an. Dies legt die Vermutung nahe, daß diesen Peptiden schon bereits während des intrauterinen Lebens bzw. in der perinatalen Phase des Föten physiologische Funktionen zukommen könnten.

Die Lokalisation von ß-LPH, α- und ß-Endorphin und ACTH in der fötalen Hypophyse des Menschen wurde immunohistochemisch in derselben Zelle gezeigt. Die Studie beschränkte sich jedoch ausschließlich auf die Hypophysenvorderlappen von Föten, die nach dem ersten Trimenon gewonnen wurden (J.Y.Li et al.) (49).

Die Hypophyse des menschlichen Föten enthält, im Gegensatz zum Erwachsenen, auch einen gut abgrenzbaren Zwischenlappen (Silman et al.) (75), welche neben ACTH hohe Konzentrationen von ACTH-Metaboliten, wie α-MSH (= N-acetyl,ACTH 1-13) und CLIP (= corticotropin-like intermediate pitiutary peptide, ACTH 18-39) enthält. Silman et al. hatten die Zusammensetzung der ACTH-ähnlichen Peptidhormone in der fötalen Hypophyse beim Menschen untersucht (75). ACTH, ß-LPH werden im Hypophysenvorderlappen produziert, α-MSH, CLIP kommen im Mittellappen des Föten vor, also beim erwachsenen Menschen allerdings nicht.

In den eigenen Untersuchungen zeigte die chromatographische Trennung des immunoreaktiven Materials aus dem Hypophysenvorderlappen eines 22 Wochen alten menschlichen Föten sowohl ß-LPH als auch ß-Endorphin in diesem Gewebe (Abb. 5e und f). Es war überraschend, daß die beiden Lappen dasselbe Verhältnis an ß-LPH/ß-Endorphin aufweisen, da das Mengenverhältnis der beiden Peptide in Ratten unterschiedlich ist. Im Vorderlappen der Rattenhypophyse ist ß-Endorphin (Bloom et al.) (8) und ACTH vorwiegend vertreten, in den Zwischen- und Hinterlappen beinahe nur ß-Endorphin und α-MSH (Przewlocki et al.) (68).

Da aber beim menschlichen Föten ein pars intermedia vorhanden ist, der kurz nach der Geburt obliteriert (Gold) (23), sind die kleinmolekularen Peptide α-MSH, CLIP und ß-Endorphin von Bedeutung für das fötale Endokrin-System; während des postnatalen Lebens haben sie anscheinend keine, oder eine veränderte, physiologische Funktion.Die ontogenetische Entwicklung des fötalen Hormonsystems ist deswegen von Interesse, weil die ACTH-ähnlichen Peptidhormone für die Einschaltung der adrenalen Funktion beim Fötus verantwortlich sind und möglicherweise die Geburt einleiten (Nathanielsz) (61). α-MSH zum Beispiel stimuliert die fötale Nebennierenrinde beim Kaninchen, das synthetische ACTH-Derivat Synachten (ACTH 1-24) war dagegen relativ ineffektiv.

Beim Rhesusaffen ist das charakteristische Peptidhormon beim Fötus auch α-MSH (Silman et al.) (76); es scheint, daß für die fötale Hypophyse α-MSH, CLIP, ß-MSH und ß-Endorphin, also die kleinmolekularen Komponenten charakteristisch sind, beim erwachsenen Rhesusaffen dagegen sind die großmolekularen Peptide ACTH, ß-LPH, γ-LPH predominant. In der Hypophyse von neugeborenen Rhesusaffen ist der Gehalt von ß-Endorphin stark erhöht (Silman et al.) (76).

Unsere Befunde, daß in der fötalen Hypophyse des Menschen mehr ß-LPH als ß-Endorphin zu finden war, stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Silman et al., die während des intrauterinen Lebens beim Rhesusaffen mehr ß-Endorphin als ß-LPH nachgewiesen haben. Man kann die Möglichkeit erwägen, daß während der phylogenetischen Entwicklung die Tendenz zur physiologischen Predominanz der großmolekularen Peptide zunimmt. Anstatt der kleinmolekularen Peptidkomponente scheint beim menschlichen Föten während des Embryonalstadiums bereits das großmolekulare ß-LPH vorherrschend zu sein (Abb. 5e, f), anscheinend als inaktive Speicherform des opiat-aktiven Endorphins.

Hette und Terenius (31) haben auch auf eine mögliche

zentrale Rolle des endorphinergen Systems während des letzten Trimesters der Trächtigkeit und während der frühen postnatalen Periode hingewiesen. Die Sterblichkeitsrate neugeborener Ratten stieg nach Naloxongabe um das 6-fache an. Dieser Effekt könnte aus einer gestörten Wachstumshormon-Sekretion resultieren; Naloxon wirkt hemmend auf die GH-Sekretion. Die Geburt des Kindes beinhaltet ein Geschehen mit höchster Gefährdung für das Kind; der Gedanke ist reizvoll, daß in diesem Moment durch eine Ausschüttung von ß-Endorphin eine "endogene Analgesie" dem Neugeborenen Schutz bietet. Unsere hohen ir-ß-END Plasmawerte (Abb. 3, 4, 6, 7) weisen tatsächlich eine vermehrte ß-Endorphin-Freisetzung des Neugeborenen während der Entbindung nach.

Die chromatographische Analyse der Plasmaextrakte ergab für ß-Endorphin und ß-LPH unterschiedliche Mengenverhältnisse der beiden Peptide im menschlichen Plasma, wobei allgemein mehr ß-LPH als ß-Endorphin gefunden wurde (Abb. 5a, c, d). Nur im Extrakt des mütterlichen Plasmas war mehr ß-Endorphin als ß-LPH vorhanden (Abb. 5b). Diesen Befund können wir der vermehrten physiologischen Freisetzung von ß-Endorphin während der Stressituation der spontanen Entbindung zuschreiben.

Immunochemisch nachweisbare Mengen (84 ± 21 fmol/ml Fruchtwasser) von ß-Endrophin wurden aus dem Fruchtwasser während der menschlichen Geburt von Gautray et al.(20) nachgewiesen. Der Zustand der Neugeborenen wurde dabei durch die Apgar-Werte festgehalten. Bei Neugeborenen, die durch sehr kompliziert verlaufende Geburten entbunden wurden, konnte ein 2 bis 20-facher (174-1640 fmol/ml Fruchtwasser) Anstieg des Peptidgehalts im Vergleich zu normal ablaufenden Geburten beobachtet werden. Da die aus dem Fruchtwasser nachgewiesenen Substanzen durch den Fötus ausgeschüttet werden, verstärkt dieser Befund die Annahme, daß die bei

den Neugeborenen nachgewiesenen hohen Gehalte an ir-ß-END im Plasma das Resultat stressbedingter Freisetzung sind.

Um die eventuelle analgetische Wirkung des freigesetzten ß-Endorphins während der Geburt zu untersuchen, haben wir Schmerz als Stressfaktor eliminiert. Unter Ausschaltung des Schmerzes durch Epiduralanästhesie wurde ir-ß-END im Plasma von Gebärenden und ihren Neugeborenen bestimmt. Vor Anlage der Epiduralanästhesie sehen wir erhöhte Werte an immunoreaktivem ß-Endorphin während der Wehe, nach Anlage der Epiduralanästhesie sieht man zunächst keinen Unterschied in den erhöhten Werten von ir-ß-END während einer weiteren Eröffnungswehe (vergleiche a mit b in Abb. 6). In der darauffolgenden Preßwehe jedoch fällt die Konzentration an ir-ß-END ab (Abb. 6c) im Gegensatz zu den normal gebärenden Schwangeren (siehe Abb. 3), bei denen die höchsten Konzentrationen an ir-ß-END während der Preßwehe gefunden wurden. Dieser Effekt kann bedeuten, daß die durch die Epiduralanästhesie ausgelöste Schmerzunempfindlichkeit die Ausschüttung von ß-Endorphin ins Blut vermindert. Dieser Effekt wirkt sich zunächst noch nicht aus, da der erhöhte ß-Endorphin-Spiegel im Plasma Zeit benötigt, um durch den biologischen Eliminationsvorgang abzufallen. Post partum sinkt dann der Gehalt an ir-ß-END - wie bei den normal Gebärenden - wieder ab. Die ir-ß-END-Konzentrationen im Nabelvenenplasma der Neugeborenen zeigen dieselben erhöhten Werte, wie Kinder, die ohne Epiduralanästhesie geboren wurden. Die weitgehende Ausschaltung der Geburtsschmerzen scheint also in Analogie zum Verhalten von ACTH (Jouppila et al.) (40) hauptsächlich einen Einfluß auf die Höhe der mütterlichen Endorphinspiegel zu haben.

Als weiteres geburtshilfliches Ereignis mit einem möglichen Einfluß anderer Stressfaktoren, wie z.B. Narkose und Operation, bot sich die operative Schnittentbindung an. Bei 12 Kaiserschnitten, die in Intubationsnarkose

mit Barbiturat, Lachgas-Sauerstoff und Halothan durchgeführt wurden, waren die Ausgangswerte an ir-ß-END im Plasma erhöht und lagen über den bei den Normalgeburten gefundenen Konzentrationen. Durch Narkose und Operationsstress kam es zwar zu einem Anstieg der mütterlichen Werte, die aber statistisch nicht signifikant waren. Das ir-ß-END im Nabelvenenplasma ist gegenüber dem mütterlichen Wert zum Zeitpunkt der Geburt erniedrigt. Nach Newsome und Rose (62) wird ACTH beim Operationsstress erhöht. Daß ir-ß-END während unserer Narkose- und Operationstests nicht erhöht wird, zeigt vielleicht einen wenigstens partiell unterschiedlichen Freisetzungsmechanismus für ACTH und ß-Endorphin.

Bei der Kontraktion oder Dilatation der Uterusmuskulatur in der Schwangerschaft könnten eventuelle endorphinerge Mechanismen eine Rolle spielen. Als Modell für endorphinerge Wirkungen auf die glatte Muskulatur dienen die Untersuchungen von Hanko und Hardebo (30). Dabei induziert Enkephalin eine Naloxon-antagonisierbare Dilatation in präparierten cerebralen Arterien, wie aus Messungen der isometrischen Tension ermittelt wurde. Weiterhin ist es aus der Literatur bekannt, daß i.v. Injektion von Morphin auch eine plötzliche Senkung im Blutdruck und eine periphere Vasodilatation verursacht (Bishop und Polak) (5). Die durch Morphin und Enkephalin induzierte Vasodilatation läuft höchstwahrscheinlich durch eine Aktivierung der postsynaptischen Opiatrezeptoren. Andererseits könnte der Uterus auch Freisetzungsfaktoren für Endorphine produzieren. Einen solchen Hinweis liefern die Befunde von Kromer et al. (46, 47). Uterusextrakte von schwangeren Meerschweinchen haben in Durchströmungsversuchen die in vitro Freisetzung von opioidaktiven Substanzen aus Schweinehypohysenvorderlappen stimuliert. Diese Freisetzung war mit Extrakten aus nichtschwangeren Uteri bzw. mit Skelettmuskulaturextrakten nicht zu erreichen.

Es wird angenommen, daß im schwangeren Uterus für endogene Opioide Freisetzungsfaktoren existieren, die in der endokrinologischen Steuerung der Geburt eine Rolle spielen könnten.

Wie aus der Literatur bekannt ist, setzen ß-Endorphin und exogene Opiatderivate neurohyphysäres Oxytocin in die Blutbahn frei (Haldar und Sawyer; Gold) (29, 23).Bei der Uteruskontraktion während der Geburt spielt Oxytocin eine wichtige Rolle (Gold) (23). In vitro wird die Uteruskontraktion von Progesteron gehemmt und durch Östrogene stimuliert. Durch Oxytocin und Prostaglandin sinkt das Progesterongehalt im Uterus und die Kontraktionen werden eingeleitet, die bei der Geburt kulminieren.

Wie Abb. 8 zeigt, scheint die Geburt einen besonders hohen Anstieg von Plasma ß-Endorphin zu bewirken, da bei acht nichtschwangeren jungen Frauen anläßlich von Curettage-Operationen unter Allgemeinanästhesie mit Lachgas/Sauerstoff/Halothan nur geringe Konzentrationen von ß-Endorphin nachzuweisen waren. Der mechanische Stimulus am Cervix bei diesen diagnostischen Ausschabungen hat hierbei ebenfalls keine Erhöhung des ir-ß-END im Plasma induziert (Abb. 8c). Auch die dabei angewendete Narkose hatte keinen Freisetzungseffekt. Diese Befunde sprechen dafür, daß die anatomischen Änderungen während der Geburt die Freisetzung von ir-ß-END nicht stimulieren. Hiermit konnte der vermutete lokale Freisetzungsstimulus durch die Dehnung des Cervix - wie es die Untersuchungen von Jacobson et al. (39) vermuten ließen - weitgehend ausgeschaltet werden.

Erhöhte Spiegel an ir-ß-END im Plasma sind nicht nur während der Geburt (Akil et al.; Csontos et al.)(1, 15, 16), sondern auch im Wochenbett (Rust et al.) (73, 74) nachzuweisen. Vier Tage nach Entbindung war ir-ß-END im Plasma von stillenden Müttern während des Stillens signifikant

höher als in der Stillpause (Abb. 9). Ähnlich erhöhte Werte für ACTH haben Voogt et al. (80) im Plasma gefunden.Da sowohl Morphin als auch Methionin-Enkephalin und ß-Endorphin die Freisetzung von Prolactin stimulieren (durch Hemmung der Synthese des Prolactin-Freisetzung inhibierenden Faktors; Gold) (23), könnte ß-Endorphin als möglicher physiologischer Freisetzungsfaktor für Prolactin in Frage kommen (während des Stillens wird vermehrt Prolactin freigesetzt; Gold) (23). Über den genauen Mechanismus der ß-Endorphin-induzierten Prolactin-Freisetzung herrscht noch keine Klarheit; wahrscheinlich ist eine Interaktion von ß-Endorphin mit anderen hypothalamisch-hypophysären Peptidhormonen von Bedeutung. Die Prolactin-Freisetzung wird durch DA, ACh (Muscarineffekt), GH, Thyroidhormone und Prolactin-Freisetzung inhibierenden Faktor (PIF) gehemmt und durch Thyrotropin-Freisetzungsfaktor (TRF) und Östrogene stimuliert. Möglicherweise spielt ß-Endorphin bei der Freisetzung von Prolactin eine intermediäre Rolle, indem es die durch dopaminerge oder cholinerge Mechanismen induzierte Hemmung der Prolactin-Freisetzung aufhebt oder durch Verstärkung der Wirkung von TRF oder Östrogenen die Spontanfreisetzung stimuliert. Eine direkte Freisetzungsaktivität des ß-Endorphins in den Hypophysen-Vorderlappen-Zellen kann auch nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß das freigesetzte ß-Endorphin direkt an den Milchdrüsen wirkt; für diese Annahme gibt es aber bis jetzt keinen Beweis. In der Muttermilch wurde jedoch immunoaktives ß-Endorphin gefunden (Höllt, persönliche Mitteilung).

Bei der Interpretation unserer Ergebnisse stellt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung des ß-Endorphins unter der Geburt. In der Verhaltensforschung werden antinociceptive Effekte von physiologisch freigesetzten opiataktiven Substanzen in zahlreichen Untersuchungen

registriert, wobei häufig mit dem Opiat-Antagonisten Naloxon gearbeitet wurde (Guillemin et al.; Marx) (26, 54). Auch beim Menschen würde sich ein solcher Weg für die Aufklärung der ß-Endorphin-Wirkung anbieten (Clarck) (10). Eine Naloxongabe als biologischer Test bei Müttern, die nicht unter Opiateinfluß standen, ist in größerem Umfang allerdings noch nicht durchgeführt worden.

Bezugnehmend auf die Thematik stellt sich die Frage, ob das endogene Opioid ß-Endorphin während der Geburt eine analgetische Wirkung im Sinne einer "endogenen Analgesie", wie es von Hosobuchi et al. (36) und Rossier et al. (70) postuliert wurde, ausübt.

Eine solche Wirkung wäre sowohl für die Mutter, als auch für das Neugeborene im Sinne eines Schutzes vor dem Geburtstrauma durchaus sinnvoll. Dazu muß klar gesagt werden, daß die gemessenen Endorphinspiegel im mütterlichen und kindlichen Plasma in der Größenordnung von 38-138 fmol/ml Plasma (das entspricht einer Molarität von $3,8 \times 10^{-11}$ bis $1,38 \times 10^{-10}$) sehr niedrig sind. Ein analgetischer Effekt nach i.v.-Injektion von ß-Endorphin bei Mäusen wurde erst bei 100-fach höheren Konzentrationen erreicht (Loh et al.) (52). Wenn wir annehmen, daß der Fötus noch keine voll entwickelte Blut-Hirnschranke besitzt und das Opiat beim Fötus und Neugeborenen eine vergleichsweise stärkere Wirkung hat (Clarck; Brackbill et al; Corke et al.; Marx; Way et al.) (10, 9, 14, 54, 82) als beim Erwachsenen (Marx; Oyama et al.) (54, 64), scheinen die peripheren Plasmawerte von ß-Endorphin vergleichsweise auch im fötalen Plasma zu niedrig, um analgetische Effekte erzielen zu können.

Es besteht jedoch eine gewisse Möglichkeit, daß hypophysäres ß-Endorphin zumindest im Fötus ins Zentralnervensystem gelangt. Im hypophysären Portalvenenplasma sind die Konzentrationen von ir-ß-END ca. 1000-mal höher als im

peripheren Plasma (Lissitzky et al.) (51). Eine Penetration größerer Endorphinmengen in die hypothalamischen Bereiche des fötalen Gehirns erscheint daher durchaus möglich, zumal der Fötus noch keine vollentwickelte Blut-Hirnschranke besitzt. Inwieweit hypothalamisches ß-Endorphin jedoch zu den für die Analgesie verantwortlichen Rezeptoren ins Mittelgehirn gelangen kann, bleibt unklar.

Eine weitere Möglichkeit wäre auch, daß hypophysäres ß-Endorphin in den Liquor gelangt und auf diesem Wege die ventrikelnahen Opiatrezeptoren im Bereich des zentralen Höhlengraus erreichen könnte. Ein direkter Beweis für diese Möglichkeit steht noch aus.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von ß-Endorphin in vivo beim Menschen in der perinatalen Periode untersucht. Mittels Radioimmunassay wurden die Konzentrationen von ß-Endorphin und ACTH im Plasma gebärender Frauen und im Nabelschnurplasma Neugeborener bestimmt. Ähnlich wie bei ACTH kommt es im Verlauf der Schwangerschaft zu einem Anstieg des immunoreaktiven ß-Endorphins (ir-ß-END) im mütterlichen Plasma mit einem Maximum unter der Geburt. Die Konzentrationen im Nabelvenenplasma des Neugeborenen sind gegenüber den mütterlichen Werten erniedrigt. Durch Gelfiltration der immunoreaktiven Komponenten wurde nachgewiesen, daß bis zu 60% des ir-ß-END aus ß-Endorphin besteht. Der Nachweis der fötalen Eigenproduktion von ß-Endorphin gelang durch Extraktion fötalen Hypophysengewebes und anschließender chromatographischer Trennung der einzelnen immunoreaktiven Komponenten.
Das Verhalten der Endorphinfreisetzung unter der Geburt nach Anlegen einer Epiduralanästhesie (schmerzfreie Geburt), sollte über die Bedeutung des Stressfaktors "Schmerz" im Rahmen des Geburtsgeschehens Auskunft geben. Daher wurden die ß-Endorphinspiegel vor und nach dem Anlegen einer Epiduralanästhesie bestimmt. Bei vorliegender Schmerzfreiheit zum Zeitpunkt der Geburt wurden niedrigere ir-ß-END-Spiegel gemessen als bei schmerzhaften Geburten. Bei den Neugeborenen wurden keine Unterschiede festgestellt.

Weiterhin wurden die Konzentrationen von ir-ß-END während operativer Schnittentbindungen bei Mutter und Kind sowie während diagnostischer Curettageoperationen bei jungen, nicht schwangeren Frauen bestimmt. Bei den Schnittgeburten fanden sich bei Mutter und Kind erhöhte Werte mit einem Maximum im Verlaufe des operativen Eingriffs. Bei Curettagen waren die Werte nur geringfügig erhöht. Im Wochenbett wurden während des Stillens gegenüber Stillpausen ebenfalls erhöhte Werte an ir-ß-END gefunden. Neben möglichen endokrinen Wirkungen von ß-Endorphin wird diskutiert, ob dieses Peptid dazu dienen könnte, das Kind vor dem Geburtstrauma abzuschirmen.

Literaturverzeichnis

1. Akil,H., S.J.Watson, J.D.Barchas, C.H.Li,
ß-endorphin immunoreactivity in rat and human blood: radioimmunoassay,comparative levels and physiological alterations.
Life Sci. 24, 1639-1666 (1979)

2. Allen,J.P., D.M.Cook, J.W.Kendall, R.McGilvra,
Maternal-fetal ACTH-relationship in man.
Journal of Clin. Endocrinol. and Metabolism,37, 230-234 (1973)

3. Arai,K., T.Yanaihara, S.Okinaga,
Adrenocorticotropic hormon in human fetal blood at delivery.
Am. J. Obstet. Gynecol. 125, 1136-1140 (1976)

4. Armstrong,A., J.W.Stewart,
Spontaneous plasma kinin formation in human plasma collected during labour.
Nature, 188, 1193-1195 (1960)

5. Bishop,A., J.M.Polak,
Peripheric peptidergic innervation.
Trends in Neurosciences, 1, 60-62 (1978)

6. Bloch,B., C.Bugnon, D.Fellmann, D.Lenys,
Immunocytochemical evidence that the same neurons in the human infundibular nucleus are stained with anti-endorphins and antisera of other related peptides.
Neuroscience Letters, 10, 147-152 (1978)

7. Bloom,F.E., E.Battenberg, J.Rossier, N.Ling, J.Leppaluoto, T.M.Vargo, R.Guillemin,
Endorphins are located in the intermediate and anterior lobes of the pituitary gland,not in the neurohypophysis.
Life Sci. 20, 43-48 (1977)

8. Bloom,F.E., E.Battenberg, J.Rossier, N.Ling, R.Guillemin,
Neurons containing ß-endorphin in rat brain exist separately from these containing enkephalin: immunocytochemical studies. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 75, 1591-1595 (1978)

9. Brackbill,Y., J.Kane, R.L.Maniello, D.Abramson,
Obstetric meperidine usage and assessment of neonatal status. Anesthesiology, 40, 116 (1974)

10. Clarck,R.B.C.,
Transplacental reveral of meperidine depression in the fetus by naloxone.
The Journal of the Arkansas Medical Society, 68, 128-130 (1971)

11. Clarck,D., A.J.Tody, S.Schuster, H.Bowers,
Immunoreactive ∝-MSH in human plasma in pregnancy
Nature, 273, 163-164 (1978)

12. Clendennin,N.J., M.Petraitis, E.J.Simon,
Ontological development of opiate receptors in rodent brain. Brain Res. 118, 157-160 (1976)

13. Clendennin,N.J., M.Petraitis, E.J.Simon,
Ontological development of opiate receptors in rodent brain. In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, Eds: J.Hughes and H.W.Kosterlitz, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1976) pp 261-266

14. Corke,B.C.
Neurobehavioral responses of the newborn. The effect of different maternal analgesia.
Anesthesia, 32, 539 (1971)

15. Csontos,K., M.Rust, W.Mahr, M.Hegemann, V.Höllt, C.Gramsch, W.Kromer, H.Teschemacher,
Endorphine: Faktoren bei der Endokrinen Steuerung der Geburt? 42. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, München, 12-16 Sept.1978. Abstr.No.162

16. Csontos,K., M.Rust, V.Höllt, W.Mahr, W.Kromer, H.J.Teschemacher,
Elevated plasma ß-endorphin-levels in pregnant women and their neonates.
Life Sci. 25, 835-844 (1979)

17. Doepfner,W.E., E.Stürmer, B.Berde,
On the corticotrophin-releasing activity of synthetic neurohypophysial hormones and some related peptides.
Endocrinology, 72, 897 (1963)

18. Dubois,P., H.Vargues-Regairaz, M.P.Dubois,
Human fetal anterior pituitary immunofluorescent evidence for corticotropin and melanotropin activities.
Z.Zllforschung, 145, 131-143 (1973)

19. Garcin,F., J.T.Coyle,
Ontogenetic development of (^{3}H)-naloxone binding and endogenous morphine-like factor in rat brain.
In: Opiates and Endogenous Opioid Peptides, Eds: J.Hughes and H.W.Kosterlitz, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1976) pp 167-273

20. Gautray,J.P., A.Jolivet, J.P.Vielh, R.Guillemin,
Presence of immunoassayable ß-endorphin human amniotic fluid: elevation in case of fetal distress.
Am.J.Obstet.Gynecol. 211-212, 15.Sept. 1977

21. Gennazana,A.R., F.Fraioli, J.Hurlimann, P.Fioretti, J.P.Felber,
Immunoreactive ACTH and cortisol plasma levels during pregnancy. Detection and partical purification of corticotropin-like placental hormone: the human chorionic corticotropin (HCC).
Clinical Endocrinology 4, 1814 (1975)

22. Gennazani,A.R., F.Frailoli, E.Frachninetti, R.Pallini, P.Tarli,
Human placental ß-endorphin.
XII. Acta Endocrinologica Congress, Munich, June 26-30,1979.
Abstr.No. 71

23. Gold, J.J.,
Gynecologic Endocrinology
Harper & Row (1975)

24. Goldstein, A.,
Opioid peptides (endrophins) in pituitary and brain.
Science, 193, 1081-1086 (1976)

25. Goldstein,A., S.Tachibana, L.I.Lowney, M.Hunkapiller, L.Hood,
Dynorphin-(1-13), an extraordinary potent opioid peptide.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 6666-6670 (1979)

26. Guillemin, R., N.Ling, R.Burgus, F.E.Bloom, D.Segal,
Characterization of the endorphins, novel hypothalamic and neurohypophyseal peptides with opiate-like activity: evidence that htey induce profound behavioral changes.
Psychoneuroendocrinology, 2, 59-62 (1977)

27. Guillemin, R., T.Vargo, J.Rossier, S.Minick, N.Ling, C.Rivier, W.Wale, F.E.Bloom,
ß-endorphin and adenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland.
Science, 197, 1367-1369 (1977)

28. Guillemin, R., N.Ling, T.Vargo,
Radioimmunoassay for α-endorphin and ß-endorphin.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 77, 361-366 (1977)

29. Haldar, J., W.R.Sawyer,
Inhibition of oxytocin release by morphine and its analogs.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 157, 476-480 (1978)

30. Hanko,J.H., J.E.Hardebo,
Enkephalin-induced dilatation of pial arteries in vitro probably mediated by opiate receptors.
European Journal of Pharmacology, 51, 295-297 (1978)

31. Hette, J., L.Terenius,
Prenatal naloxone affects survival and morphine-sensitivity of rat offspring.
Neuroscience Letters, 16,323-327 (1980)

32. Höllt,V., O.A.Müller, R.Fahlbusch,
ß-endorphin in human plasma: basal and pathologically elevated levels.
Life Sci. 25, 37-44 (1979)

33. Höllt,V., H.M.Emrich, O.A.Müller, R.Fahlbusch,
ß-endorphin-like immunoreactivity (ß-ELIR) in human plasma and cerebrospinal fluid (CSF).
In: Characteristics and Function of Opioids, Eds: Van Ree,J. and L.Terenius, Elsevier/North Holland Biomedical Press (1978) pp 279-280

34. Höllt,V., R.Przewlocki, A.Herz,
Radioimmunoassay of ß-endorphin. Basal and stimulated levels in extracted rat plasma.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 303, 171-174 (1978)

35. Hong,J.S., A.M.Poisner,
Effect of low remperature on the release of vasopressin from the isolated bovine neurosecretory granules.
Neuroendocrinology, 16, 165-177 (1977)

36. Hosobuchi,Y., R.Rossier, F.E.Bloom, R.Guillemin,
Stimulation of human periaqueductal gray for pain relief increases immunoreactive ß-endorphin in ventricular fluid.
Science, 203, 279-281 (1979)

37. Houck,J.C., C.Kimball, C.Chang,
Placental ß-endorphin-like peptides.
Science, 207, 78-80 (1979)

38. Hughes,J., L.W.Smith, H.W.Kosterlitz, L.A.Fothergill, B.A.Morgan, H.R.Morris,
Identification of two related pentapeptides from the brain

with potent opiate agonist activity.
Nature, 258, 577-579 (1975)

39. Jacobson,A., H.A.Salhanick, M.X.Zarrow,
Induction of pseudopregnancy and its inhibition by various drugs.
Am.J.Physiol. 161, 522-527 (1950)

40. Jouppila,R., A.Hollmen, P.Jouppila, A.Kauppila, R.Tuimala,
The effect of segmental epidural anesthesia on maternal ACTH, cortisol and TSH during labour.
Annals of Clinical Research, 8, 378-387 (1976)

41. Julliard,H.J., T.Shibashaki, N.Ling, R.Guillemin,
High molecular weight immunoreactive ß-endorphin in extracts of human placenta is a fragment of immunoglobulin G.
Science, 308, 183-185 (1980)

42. Kanagawa,K., H.Matsuo, M.Igarashi,
α-neo-endorphin: a "big" leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalami.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 86, 153-160 (1979)

43. Kauppila,A., R.Tuimala, J.Haapalahti,
Maternal adrenocorticotropic hormone and cortisol during labour and vaginal delivery.
The Journal of Obstetric and Gynecology of the British Commonwealth 81, 691-694 (1974)

44. Krieger,D.T., A.Liotta, T.Suda, M.Palkovits, M.J.Brownstein,
Presence of immunoassayable ß-lipotropin in bovine brain and spinal cord lack of concordance with ACTH concentrations.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 76, 930-936 (1977)

45. Krieger,D.T., A.Liotta, C.H.Li,
Human plasma immunoreactive ß-lipotropin: correlation with basal and stimulated plasma ACTH-concentrations.
Life Sci. 21, 1771-1778 (1977)

46. Kromer,W., C.Fisher, H.Teschemacher,
Extracts of uterine tissue stimulate endorphin release from anterior pituitary in vitro.
Neuroscience Letters, 8, 259-263 (1978)

47. Kromer,W., C.Fisher, K.Csontos, V.Höllt,
Indication for a role of endorphins in pregnancy or birth.
Neuroscience Letters, Suppl.1, S:237 (1978)

48. Li,C.H.,
Hormonal proteins and peptides. Vol.V. Lipotropin and Related Peptides, Academic Press N.Y. (1978)

49. Li,J.Y., M.P.Dubois, P.M.Dubois,
Ultrastructural localisation of immunoreactive corticotropin, ß-lipotropin, α-and ß-endrophin in cells of the human fetal anterior pituitary.
Cell Tissue Res. 204, 37-51 (1979)

50. Liotta,A.S., C.H.Li, G.S.Schussler, D.T.Krieger,
Comparative metabolic clearance rate, volume of distribution and plasma half-life of human ß-lipotropin and ACTH.
Life Sci. 23, 2323-2330 (1978)

51. Lissitzky,J.C., P.Giraud, R.I.Eskay, C.Oliver,
ß-endorphin is present in high concentration in the hypophyse portal vessels.
XII. Acta Endocrinologica Congress Munich, June 26-30 1979.
Abstr. No. 73.

52. Loh,H.H., L.F.Tseng, E.Wei, C.H.Li,
ß-endorphin is a potent analgesic agent.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 3014-3018 (1977)

53. Mains,R., B.Eipper, N.Ling,
Common precursor to corticotropins and endorphins.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 3014-3018 (1977)

54. Marx,G.I.,
Clinical management for mother and newborn.
Springer Verlag, New York-Heidelberg-Berlin (1979)

55. Meites,J., J.F.Bruni, D.A.Van Vugt, A.F.Smith,
Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions.
Life Sci. 24, 1325-1345 (1979)

56. Migeon,C.J., H.Prystowsky, M.M.Grumbach, M.C.Byron,
Placental passage of 17-hydrocorticosteroids: comparison of the levels in maternal and fetal plasma and effect of ACTH and hydrocortisone administration.
The Journal of Clinical Investigation, 35, 488-493 (1956)

57. Moya,F., V.Thorndike,
The effects of drugs used in labor on the fetus and newborn.
Clinical Pharmacology and Therapeutics, 4, 628-653 (1956)

58. Nakai,Y., K.Nakao, S.Oki, H.Imura,
Presence of immunoreactive ß-lipotropin and ß-endorphin in human placenta.
Life Sci. 23, 2013-2018 (1978)

59. Nakanishi,S., A.Inoue, T.Kita, M.Nakamura, A.C.Y.Chang, S.N.Cohen, S.Numa,
Nucleotide sequence of cloned c-DNA for bovine corticotropin-ß-lipotropin precursor.
Nature, 278, 423-427 (1979)

60. Nakao,K., Y.Nakai, S.Oki, K.Horii, H.Imura,
Presence of immunoreactive ß-endorphin in normal human plasma.
J.Clin.Invest. 62, 1395-1398 (1978)

61. Nathanielsz,P.W.,
Endocrine mechanisms of parturition.
Ann.Rev.Physiol. 40, 411-445 (1978)

62. Newsome,H.H., J.C.Rose,
The response of human adrenocorticotropic hormine and growth

hormone to surgical stress.
J.Clin.Endocrinol. 33, 481-487 (1971)

63. Odagiri,E., B.J.Sherrel, C.D.Mount, W.E.Nicholson, D.N.Orth,
Human placental immunoreactive corticotropin, ß-lipotropin,
and ß-endorphin: evidence for a common precursor.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 2027-2031 (1979)

64. Oyama,T., T.Jin, R.Yamaya, N.Ling, R.Guillemin,
Profound analgesic effects of ß-endorphin in man.
The Lancet, Jan. 1980, 122-124

65. Pelletier,G., R.Leclerc, F.Labrie, J.Cote, M.Chretien, M.Lis,
Immunohistochemical localisation of ß-lipotropic hormone
in the pituitary gland.
Endorcinology, 100, 770-776 (1977)

66. Pert,C.B., S.H.Snyder,
Opiate receptor: demonstration in nervous tissue.
Science, 179, 1011-1014 (1973)

67. Phifer,R.F., D.N.Orth, S.S.Spicer,
Specific demonstration of the human hypophyseal adrenocortico-
tropic-melanotropic (ACTH/MSH) cell.
Journal of Clin. Endocrinol. and Metabolism, 39, 684-692 (1974

68. Przewlocki,R., V.Höllt, A.Herz,
Release of ß-endorphin from rat pituitary in vitro.
European Journal of Pharmacology, 51, 179-183 (1978)

69. Rees,L.H., C.W.Burke, T.Chard, S.W.Evans, A.T.Letchworth,
Possible placental origin of ACTH in normal human pregnancy.
Nature, 256, 620-622 (1978)

70. Rossier,J., E.D.French, C.Rivier, N.Ling, R.Guillemin, F.E.Bloom,
Foot-shock induced stress increases ß-endorphin levels in
blood but not brain.
Nature, 270, 618-620 (1977)

71. Rossier,J., T.M.Vargo, S.Minick, F.Bloom, R.Guillemin,
Regional distribution of ßendorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 5162-5165 (1977)

72. Rubinstein,M., S.Stein, S.Udenfriend,
Characterization of pro opiocortin, a precursor to opioid peptides and corticotropin.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 669-671 (1978)

73. Rust,M., K.Csontos, W.Mahr, Th.Zilker, M.Hegemann, H.Teschemacher,
Zum Verhalten von ß-Endorphin in der Perinatalperiode.
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 40, (1980)

74. Rust,M., K.Csontos, V.Höllt, H.Teschemacher, W.Mahr,
Endorphine-Endogene Analgetika bei der Geburt?
Zentraleuropäischer Anästhesiekongress Inssbruck, 6-9 Sept.79, Abstr. No. 57.

75. Silman,R.E., T.Chard, P.J.Lowry, I.Smith, I.M.Young,
Human fetal pituitary peptides and parturition.
Nature, 260, 716-718 (1976)

76. Silman,R.E., D.Holland, T.Chard, P.J.Lowry, J.Hope, J.S.Robinson, G.D.Thornburn,
The ACTH "family tree" of the thesus monkey changes with development.
Nature, 276, 526-528 (1978)

77. Simon,E.J., J.M.Hiller, I.Edelmann,
Stereospecific binding of the narcotic analgesic (^{3}H)etorphine to rat brain homogenate.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 202, 1947-1949 (1973)

78. Suda,T., A.Liotta, D.Krieger,
ß-endorphin is not detectable in plasma from normal human subjects.
Science, 202, 221-223 (1978)

79. Terenius,L.,
Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex.
Acta Pharmacol. (Kbh) 32, 317-320 (1973)

80. Voogt,J.L., M.Saar, J.Meites,
Influence of cycling, pregnancy, labor and suckling on corticosterone-ACTH levels.
American Journal of Physiology 216, 655-658 (1969)

81. Wardlaw,S., A.G.Frantz,
Measurement of ß-endorphin in human plasma.
Journal of Clin. Endocrinol. and Metabol. 48, 176-180 (2979)

82. Way,W.L., E.C.Cortley, E.L.Way,
Respiratory sensitivity of the newborn infant to meperidine and morphine.
Clin. Pharmacol. Ther. 6, 454 (1965)

83. Weber,E., K.H.Voigt, R.Martin,
Concomitant storage of ACTH- and endorphin-like immunoreactivity in the secretory granules of anterior pituitary corticotrophs.
Brain Res. 157, 385-390 (1978)

84. Wiedemann,E., T.Saito, J.A.Linfoot, C.H.Li,
Radioimmunoassay of human ß-lipotropin in unextracted plasma.
Journal of Clin. Endocrinol. and Metabol. 45, 1108-1111 (1977)

85. Winters,A.J., C.Oliver, C.Colston, P.C.MacDonald, J.C.Porter,
Plasma ACTH levels in the human fetus and neonate as related to age and parturition.
Journal of Clin. Endocrinol. and Metabol. 39, 269-273 (1974)

86. Zimmermann,E.,
Peptides in the brain and gut.
Federation Proceedings 38, 2286-2348 (1979)

87. Zimmermann,E., A.Liotta, D.T.Krieger,
ß-lipotropin in brain: localisation in hypothalamic neurons by immunoperoxydase technique.
Cell Tiss. Res. 186, 393-398 (1978)

Lebenslauf

Name:	Katharina C s o n t o s
Geburtsdatum:	12. Februar 1949
Geburtsort:	Budapest
1955 - 1963	Grundschule Budapest
1963 - 1967	Gymnasium Budapest
1967 (Juni)	Abitur
1967 - 1970	Studium an der Universität Szeged (Jozsef Attila Tudomanyegyetem) Fakultät der Naturwissenschaften (Biologie und Chemie)
1970	Einbürgerung in die Bundesrepublik Deutschland in Heidelberg
1970 - 1975	Studium der Biologie an der Universität Heidelberg
1975	Diplom in Biologie an der Universität Heidelberg
1976 - 1979	Doktorarbeit im Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung für Neuropharmakologie in München